INSTITUTUL DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE IAŞI

FACULTATEA DE STOMATOLOGIE

MICROBIOLOGIE MEDICALĂ PRACTICĂ

Prof. Dr. SOFIA-FELICIA TIMOŞCA

Dr. VIORICA PETREANU şi Dr. MARIANA LUCA

1989

Scanned with OKEN Scanner

INSTITUTUL DE MEDICINA SI FARMACIE IASI
FACULTATEA DE STOMATOLOGIE

David Vaggas

M I C R O B I O L O G I E   M E D I C A L A
P R A C T I C A

PROF.DR. SOFIA-FELICIA TIMOSCA
SEF LUCRARI DR.VIORICA PETREANU
SEF LUCRARI DR.MARIANA LUCA

- 1989 -

Scanned with OKEN Scanner

P R E F A T A

Alcătuirea manualului de lucrări practice pentru studenții Facultății de Stomatologie a plecat de la considerentul că patologia stomatologică și maxilo-facială include un mare număr de afecțiuni cu etiologie microbiană primară sau secundară. Așa cum arăta, cu multă competență, Dreizen „cavitatea bucală este o veritabilă comoară de chei de diagnostic pe care o poate descoperi numai un stomatolog avizat, înarmat cu temeinice cunoștințe de medicină".

Medicul stomatolog lucrează în una din cavitățile naturale ale organismului cu cea mai numeroasă și mai variată floră microbiană, așa numita „microbiotă indigenă", de aceea trebuie să cunoască temeinic metodele de sterilizare și antisepsie ceea ce îi va permite să lucreze în condiții adecvate de securitate personală și în același timp să evite transmiterea microbilor de la un pacient la altul și apariția consecutivă a unor boli „iatrogene".

Insușirea noțiunilor de microbiologie de către studentul stomatolog mai este necesară pentru motivul că multe boli generale cauzate de bacterii pot avea răsunet la nivelul cavității bucale și multe infecții produse de „microbiota indigenă" a gurii pot fi punctul de plecare a unor boli de vecinătate sau la distanță. De asemenea unele virusuri, ca și unii paraziți pot cauza îmbolnăviri cu manifestări în teritoriul stomatologic. Pentru a putea stabili diagnosticul în aceste boli, medicul stomatolog trebuie mai întîi avizat că ele există; apoi el trebuie să știe ce produse patologice trebuie recoltate pentru a fi trimise laboratorului, cum să le recolteze și cum să interpreteze rezultatele examenului bacteriologic. In același timp, instituirea unei terapii adecvate reclamă cunoașterea mecanismelor și a spectrului de acțiune a antibioticelor, precum și a modului de interpretare corectă a datelor furnizate de antibiogramă.

Scanned with OKEN Scanner

Manualul de lucrări practice care totalizează 286 pagini, este structurat în 3 părţi: noţiuni practice de bacteriologie, de virologie şi parazitologie.

Prima parte cuprinde 20 capitole din care 7 includ cunoştinţe de bacteriologie generală şi imunologie cu referiri, acolo unde se pretează, la domeniul stomatologiei; celelalte 13 capitole de bacteriologie specială prezintă diagnosticul de laborator în unele infecţii care afectează organismul în totalitate dar pot avea manifestări şi la nivelul cavităţii bucale, precum şi în infecţii localizate predominant în teritoriul stomatologic sau cu punct de plecare de la acest nivel.

A doua şi a treia parte, structurate în 9 şi respectiv 2 capitole, prezintă succint etapele diagnosticului de laborator în unele viroze şi respectiv parazitoze cu implicaţii la nivelul cavităţii bucale, precum şi în infecţiile mai frecvent întîlnite în ţara noastră.

In redactarea materialului s-a încercat utilizarea unui stil clar şi concis, precum şi ilustrarea sa cu o bibliografie bogată şi sugestivă care să permită studenţilor o mai uşoară asimilare a cunoştinţelor.

Autorii

CUPRINS

PARTEA I-A

NOTIUNI PRACTICE DE BACTERIOLOGIE

	Pag.
I. DECONTAMINAREA	1
A. Sterilizarea	1
1. Sterilizarea prin agenți fizici	1
2. Sterilizarea chimică	11
B. Dezinfecția	12
1. Dezinfecția prin agenți fizici	12
2. Dezinfecția prin agenți chimici	13
C. Antiseptizarea	14
II. MASURI DE PROTECTIE IN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE SI METODICA LUCRULUI ASEPTIC	15
A. Măsuri de protecție	15
B. Metodica lucrului aseptic	16
III. RECOLTAREA SI TRANSPORTUL PRODUSELOR PATOLOGICE	18
A. Principii generale de recoltare și transport	18
B. Metode de recoltare a produselor patologice	20
1. Sîngele	20
2. Lichidul cefalorahidian	23
3. Exsudatele purulente	24
4. Exsudatul nasofaringian	25
5. Sputa	26
6. Urina	28
7. Materiile fecale	29
8. Produsele buco-dentare	31
IV. METODE DE EVIDENTIERE A BACTERIILOR DIN PRODUSE PATOLOGICE	34

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

A. Examenul microscopic 34
1. Preparat microscopic umed 34
2. Preparat microscopic colorat 35
B. Izolarea bacteriilor 41
1. Izolarea „in vitro" 41
2. Izolarea „in vivo" 48

V. METODE DE IDENTIFICARE A BACTERIILOR 50
A. Cercetarea caracterelor morfotinctoriale şi de mobilitate 50
B. Cercetarea caracterelor de cultură 50
C. Cercetarea caracterelor biochimice 52
D. Cercetarea caracterelor de patogenitate 53
E. Cercetarea structurii antigenice 54
F. Sensibilitatea la bacteriofagi 63

VI. METODE DE EVIDENTIERE A ANTICORPILOR 65
A. Metode „in vitro" 65
B. Metode „in vivo" 74

VII. METODE DE LABORATOR IN CONDUCEREA ANTIBIOTICOTERAPIEI 76
A. Determinarea sensibilităţii bacteriilor la antibiotice (antibiograma) 76
1. Metoda difuzimetrică 77
2. Metoda diluţiilor 82
B. Determinarea concentraţiei antibioticelor în umori în cursul antibioticoterapiei 84

VIII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR IN INFECTIILE CAUZATE DE COCI GRAM-POZITIVI ASEZATI IN GRAMEZI 88

IX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR IN INFECTIILE CAUZATE DE COCI GRAM-POZITIVI ASEZATI IN LANTURI 94
A. Diagnosticul de laboratorl al anginei streptococice 95
B. Diagnosticul de laborator al endocarditei subacute streptococice 100
C. Diagnosticul de laborator al pneumoniei pneumococice 102

X. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE COCI GRAM-NEGATIVI 105
A. Diagnosticul de laborator al meningitei meningococice 106

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

B. Diagnosticul de laborator al infecţiilor cauzate de Neisseria gonorrhoeae 109

XI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE COCOBACILI GRAM-NEGATIVI 113

A. Diagnosticul de laborator al infecţiilor produse de Haemophilus influenzae 113

B. Diagnosticul de laborator al infecţiilor cauzate de Actinobacillus actinomycetemcomitans 116

XII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CU BACILI GRAM-NEGATIVI FACULTATIV ANAEROBI DIN FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE 118

A. Diagnosticul de laborator al febrelor enterice . 119

B. Diagnosticul de laborator al dizenteriei bacilare 127

C. Diagnosticul de laborator al infecţiilor cauzate de enterobacteriacee condiţionat sau accidental patogene 129

XIII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CU BACILI GRAM-NEGATIVI AEROBI DIN GENUL PSEUDOMONAS 135

XIV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL UNOR INFECTII CAUZATE DE BACILI GRAM-POZITIVI NESPORULATI 139

A. Diagnosticul de laborator al difteriei 140

B. Diagnosticul de laborator al endocarditei cu lactobacili 144

C. Diagnosticul de laborator al actinomicozei cervico-faciale 146

XV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE BACILI GRAM-POZITIVI SPORULATI 151

A. Diagnosticul de laborator al antraxului 152

B. Diagnosticul de laborator al infecţiilor cauzate de Cl.perfringens 155

C. Diagnosticul de laborator al tetanosului 157

D. Diagnosticul de laborator al botulismului . . . 159

XVI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CU BACTERII ANAEROBE NESPORULATE (FLORA VEILLON) 161

XVII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE BACILI ACIDO-ALCOOLO-REZISTENTI 166

Scanned with OKEN Scanner

Pag.

A. Diagnosticul de laborator al tuberculozei pulmonare 167

B. Diagnosticul de laborator al tuberculozei extrapulmonare 172

C. Diagnosticul de laborator în lepră 174

XVIII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL UNOR INFECTII CAUZATE DE SPIROCHETE 177

A. Diagnosticul de laborator al sifilisului . . . 177

B. Diagnosticul de laborator al leptospirozelor . 185

XIX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE MICOPLASME 189

XX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL CANDIDOZEI BUCALE . . . 193

PARTEA II-A

NOTIUNI PRACTICE DE VIROLOGIE

XXI. PRINCIPII GENERALE ALE DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR IN VIROZE 198

XXII. DIAGNOSTICUL VIROLOGIC 204

A. Metode rapide de diagnostic 204

B. Izolarea virusurilor 207

C. Identificarea virusurilor 214

XXIII. DIAGNOSTICUL SEROLOGIC 217

XXIV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VIROZELOR RESPIRATORII. 221

XXV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VIROZELOR ERUPTIVE . . 229

XXVI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ENTEROVIROZELOR 236

XXVII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL NEUROVIROZELOR 239

XXVIII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE . . 246

XXIX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR IN SINDROMUL DE IMUNODEFICIENTA DOBINDITA 251

PARTEA III-A

NOTIUNI PRACTICE DE PARAZITOLOGIE

XXX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE PROTOZOARE 255

A. Sarcomastigophora 255

Pag.
A. Sarcodina 255
1. Evidenţierea Entamoeba gingivalis 256
B. Mastigophora 256
1. Evidenţierea Trichomonas tenax 257
2. Diagnosticul trichomoniazei genito-urinare . . 257
3. Diagnosticul de laborator al giardiozei . . . 259
II. Apicomplexa 260
A. Sporozoa 261
1. Diagnosticul de laborator al toxoplasmozei . . 261
2. Diagnosticul de laborator al pneumocistozei . 263
3. Diagnosticul de laborator al malariei 264
III. Ciliophora 268
1. Diagnosticul de laborator al balantidiozei . . 268
XXXI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE HELMINTI 270
I. Plathelmintes 270
A. Trematoda 270
B. Cestoda 270
1. Diagnosticul de laborator al teniazei 271
2. Diagnosticul de laborator al cisticercozei . . 274
3. Diagnosticul de laborator al hidatidozei . . . 275
II. Nemathelmintes 276
1. Diagnosticul de laborator al ascaridiozei . . 277
2. Diagnosticul de laborator al enterobiozei . . 279
3. Diagnosticul de laborator al trichinozei . . . 280
BIBLIOGRAFIE 285

NOTIUNI PRACTICE DE BACTERIOLOGIE

I. DECONTAMINAREA

Prin decontaminare se înțelege îndepărtarea sau distrugerea microbilor care au contaminat interiorul sau suprafața unui corp. Ea include noțiunile de <u>sterilizare</u>, <u>dezinfecție</u> și <u>antisepsie</u>.

Decontaminarea are largi aplicații în întreaga activitate practică medicală, inclusiv în stomatologie; pentru laboratorul de microbiologie, decontaminarea reprezintă o condiție esențială în efectuarea unui diagnostic etiologic corect.

Decontaminarea se poate realiza prin agenți fizici sau chimici în funcție de natura materialului supus decontaminării.

A. STERILIZAREA

Sterilizarea cuprinde metodele prin care sînt omorîte toate formele vegetative și sporulate ale microbilor patogeni și nepatogeni dintr-o substanță sau de pe suprafața unui corp. Astfel, <u>noțiunea de steril semnifică absența totală a microbilor vii.</u>

1. Sterilizarea prin agenți fizici

a. Sterilizarea prin căldură

Căldura este factorul de sterilizare cel mai larg utilizat; ea se poate folosi sub formă de căldură uscată sau umedă.

- **Căldura**
  - uscată
    - Sterilizarea cu aer cald (poupinel)
    - Flambarea
    - Incălzirea la roșu
    - Incinerarea
  - umedă
    - Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune (autoclav)
    - Tyndallizarea

Efectul letal al căldurii asupra microorganismelor este cu atît mai rapid cu cît conținutul celulei în apă este mai mare, de aceea sporii microbieni vor fi distruși la temperaturi mai ridicate și într-un interval de timp mai prelungit decît formele vegetative.

Scanned with OKEN Scanner

1. Sterilizarea prin căldură uscată

• Sterilizarea prin aer cald se efectuează în cuptorul poupinel. Sterilizatorul este o cutie metalică de formă paralelipipedică sau cilindrică, cu pereţii dubli, între care circulă aerul cald care pătrunde în interiorul aparatului printr-un sistem de orificii. Incălzirea aerului se face cu ajutorul unor rezistenţe electrice montate la partea inferioară a aparatului care prezintă şi un termoregulator ce permite menţinerea temperaturii de sterilizare. La partea superioară a cuptorului se găseşte un sistem de ventilaţie (pentru eliminarea urmelor de vapori de apă) şi un orificiu în care se introduce un termometru de 200°C, coloana de citire fiind situată în afară (fig.1).

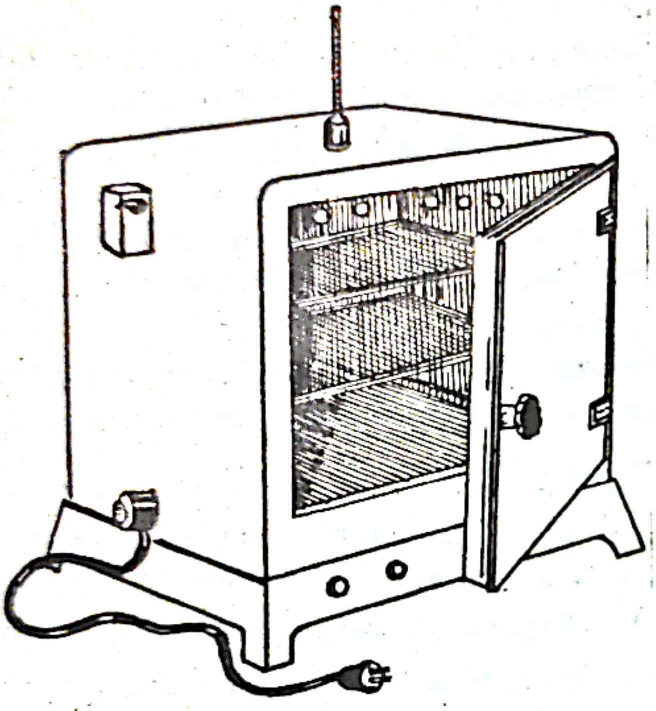


Fig. 1. Poupinel

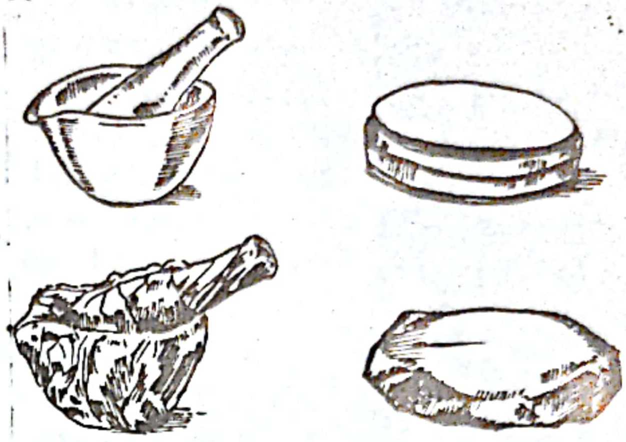
Sterilizarea prin aer cald se realizează la temperatura de 180°C, un interval de timp variabil în raport cu natura şi volumul materialelor supuse sterilizării. Pentru sticlăria de laborator, instrumentarul metalic, ambalaje de volum redus, sterilizarea se realizează în mod obişnuit în 60 minute.

Indicaţiile sterilizării la poupinel:

- sticlăria de laborator (eprubete, baloane, tuburi şi pipete Pasteur, pipete gradate, cutii Petri etc.),
- obiecte din porţelan (mojare, capsule etc.),
- seringi în întregime din sticlă - tip Luer,
- instrumentarul metalic chirurgical (foarfece, pense, bisturie etc.) şi stomatologic (cleşti de extracţie, elevatoare, chiurete, dălţi etc.),
- instrumentarul endodontic (ace de canal, freze, discuri etc.),
- unele pulberi (talc), uleiuri (vaselină, parafină).

Pregătirea materialului pentru sterilizare

Materialul supus sterilizării va fi bine curățat, spălat și uscat și apoi pregătit în mod special pentru menținerea sterilității pînă la întrebuințare [x]. Astfel, o parte din sticlăria de laborator (plăci Petri, mojare etc.) va fi împachetată complet în hîrtie sau protejată numai cu capac din hîrtie (pahare conice, cilindri gradați, cristalizoare)(fig.2).



b a

Fig.2 Pregătirea cutiei Petri (a) și a mojarului (b) în vederea sterilizarii.

Orificiile eprubetelor, baloanelor, pipetelor vor fi astupate cu dopuri de vată și tifon; pipetele Pasteur vor fi închise la flacără la unul din capete, iar cele gradate învelite complet în hîrtie sau menținute în cilindri metalici cu capac (fig.3).

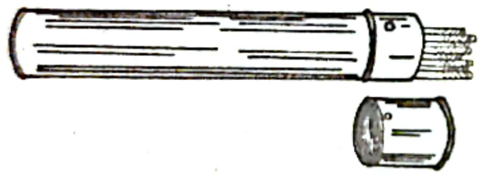


Fig. 3 Pipete gradate pregătite pentru sterilizare.

Seringile din sticlă se sterilizează montate și împachetate în hîrtie. Pentru anumite indicații, de ex. hemocultura, seringa Luer se introduce gata montată cu acul în

---

[x] a. Sticlăria utilizată (eprubete, cutii Petri, recipiente de recoltare a produselor patologice etc.), care conține material infecțios, trebuie întîi sterilizată prin autoclavare o oră la 134°C, după care va fi spălată cu apă caldă și detergenți, folosind perii speciale. Se limpezește din abundență cu apă de robinet și se clătește de 3-4 ori cu apă distilată, se usucă în stative.

b. Pipetele gradate și Pasteur folosite se mențin 24-48 ore în amestec oxidant sulfocromic, se spală apoi la curent de apă, se clătesc cu apă distilată și se usucă în poziție verticală.

c. Instrumentarul metalic, seringile și acele, imediat după întrebuințare, vor fi bine curățate manual, de către un cadru mediu care poartă mănuși și halat de protecție, prin periaj într-o baie de bromocet 2% în apă caldă, 20 minute. Lumenul acelor de seringă se curăță cu mandrenul. In cazul intervențiilor sîngerînde, procesul dezinfecției va continua cu a doua baie de amoniac 2%, 15-20 minute, după care materialele vor fi clătite cu apă călduță. Băile de spălare vor fi inactivate cu cloramină 5%. Cea mai bună metodă de curățire a instrumentarului stomatologic de urmele de sînge și salivă este ultrasonarea în baie de detergent.

tuburi speciale din sticlă portseringă sau în eprubete mari astupate cu dop de vată și capișon din hîrtie (fig.4).

Fig. 4 Seringă Luer pentru hemocultură.

Instrumentele chirurgicale și stomatologice se sterilizează în cutii metalice speciale.

Funcționarea aparatului. Obiectele pregătite pentru sterilizare se așează pe rafturi, fără să vină în contact direct cu pereții și lăsînd mici spații între ele pentru a permite circulația cu ușurință a aerului cald în interior. Se închide ușa cuptorului, se face contactul electric și se deschid orificiile de ventilație timp de 10 minute pentru a se elimina urmele de vapori de apă. Apoi se închide sistemul de ventilație și se urmărește termometrul exterior pînă indică 180 °C, această temperatură menținîndu-se timp de 60 minute. După terminarea sterilizării se întrerupe sursa electrică, se așteaptă ca aerul din interior să se răcească sub 100 °C, după care se scot obiectele.

Fig. 5 Sterilizarea ansei la flacără.

• Incălzirea la roșu constă în menținerea obiectului de sterilizat în flacăra unui bec de gaz sau a unei lămpi cu alcool pînă la incandescență (fig.5). Ea este recomandată pentru firul, spatula și ansa bacteriologică înainte și după întrebuințare.

• Flambarea constă în trecerea rapidă și repetată, timp de cîteva secunde, prin flacără, a obiectului de sterilizat. Această metodă se folosește pentru suprafața exterioară a pipetei Pasteur (după ruperea vîrfului), a pipetei gradate (după despachetarea din hîrtie), pentru gura eprubetelor și a baloanelor, tija ansei (fig.6).

Incălzirea la roșu și flambarea sînt contraindicate pentru

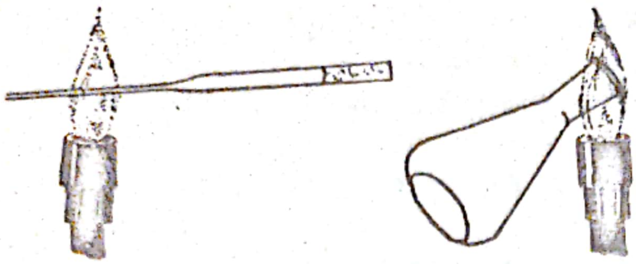


Fig. 6 Sterilizare prin flambare.
a. pipeta Pasteur ; b. gura unui balon.

sterilizarea instrumentelor metalice (pense, foarfece, ace de seringă, bisturie etc.) deoarece se degradează.

• Incinerarea se utilizează pentru reziduurile contaminate (pansamente, comprese, animale de experienţă infectate şi sacrificate etc.).

ii. Sterilizarea prin căldură umedă

• Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune se realizează la autoclav. Ea reprezintă una din metodele cele mai utilizate deoarece permite sterilizarea la o temperatură mai joasă decît prin aer cald; acest lucru se datoreşte faptului că prin hidratare bacteriile devin mai bune conducătoare de căldură.

Principiu: temperatura vaporilor de apă într-un vas închis creşte proporţional cu presiunea la care sînt supuşi. Astfel cînd presiunea atinge 1/2 atmosferă temperatura vaporilor este egală cu 115°C; presiunea de 1 atmosferă corespunde unei temperaturi de 121°C iar 2 atmosfere la 134°C. Durata sterilizării variază în raport cu volumul şi natura materialelor introduse în autoclav. De ex. sterilizarea instrumentarului în cutii metalice se realizează la 121°C în 30 minute iar a materialului din bumbac introdus în caselete în 45 minute.

Indicaţiile sterilizării la autoclav:

- materialul contaminat din laborator (căldările cu infecte);
- medii de cultură;
- sticlăria de laborator cu destinaţii speciale (recoltarea sîngelui pentru examen serologic, culturi de celule etc.);
- tampoane de vată pentru recoltarea exsudatelor de pe mucoase, plăgi;
- apă distilată, soluţie salină izotonă;
- obiecte din cauciuc (dopuri, sonde, tuburi de dren, mănuşi chirurgicale etc.);

- seringi cu armatură metalică (seringi Record), instrumentarul chirurgical, inclusiv cel stomatologic;
- dispozitive alcătuite din sticlă, metal şi cauciuc (trusă de perfuzie, aparate de filtrare etc.);
- materiale din bumbac (tifon, vată, cîmpuri operatorii, halate etc.).

Pregătirea materialului pentru sterilizare

Mediile de cultură, soluţiile, se repartizează în recipiente din sticlă sterile (eprubete, baloane etc.), ale căror orificii vor fi bine astupate cu dopuri din vată şi tifon, apoi acoperite cu hîrtie şi legate cu sfoară. Obiectele mici (sticluţe, eprubete, baloaşe), pregătite ca mai sus, vor fi puse în panere de sîrmă sau tablă perforată şi introduse în autoclav.

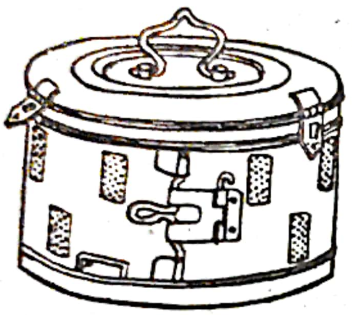


Fig. 7 Casoletă

Obiectele din cauciuc, lenjeria chirurgicală, pansamente, vată, materialul de sutură sînt aşezate în casolete[x)] (fig.7).

Instrumentarul chirurgical, seringile şi acele lor, după dezinfecţie şi spălare (vezi pag.3, punctul c), se pun de asemenea în cutii metalice; seringile Record se sterilizează demontate, corpul şi pistonul fiecărei seringi fiind învelite separat în tifon.

Autoclavul este alcătuit dintr-un cazan de sterilizare cu pereţii metalici rezistenţi, prevăzut cu un capac care se închide ermetic cu ajutorul unor şuruburi mari (buloane) şi a unei garnituri din pîslă sau cauciuc ce se interpune în cerc între cazan şi capac. Aparatul prezintă un **manometru** care indică presiunea, un **robinet de vapori** care serveşte pentru evacuarea aerului şi vaporilor produşi în cazan şi o **supapă de siguranţă**, cu deschidere automată, care permite evacuarea vaporilor atunci cînd presiunea este prea mare şi aparatul nesupravegheat riscă să explodeze.

[x)] Cutii metalice cu capac şi prevăzute cu orificii care lasă să pătrundă vaporii de apă în timpul sterilizării; orificiile se închid ermetic la scoaterea casoletelor din autoclav.

In laboratoare și farmacii se folosește autoclavul vertical, cu perete simplu, care prezintă la exteriorul cazanului de sterilizare un înveliș de tablă groasă; la partea inferioară este situată sursa de căldură, de obicei aragaz sau gaz metan (fig. 8).

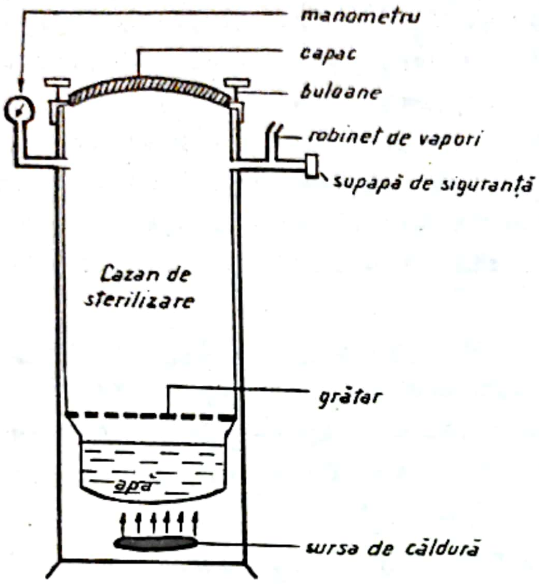


Fig. 8 Autoclav vertical cu perete simplu. (schematizare)

La acest tip de autoclav vaporii provin din încălzirea apei care se introduce chiar în interiorul cazanului de sterilizare. Persistența vaporilor de apă pînă la deschiderea capacului menține umede materialele din bumbac, alterează obiectele metalice, de aceea autoclavul cu perete simplu este indicat pentru sterilizarea soluțiilor și mediilor de cultură.

Funcționare. Se introduce în cazan apă distilată pînă la cîțiva centimetri sub nivelul grătarului mobil. Pe acest suport sînt așezate obiectele de sterilizat în așa fel încît să se asigure circulația vaporilor de apă; tot materialul se acoperă cu hîrtie pentru ca dopurile de vată de la recipiente să nu se umezească cu apa provenită din condensarea vaporilor. Se închide capacul și apoi buloanele două cîte două, diametral opuse, în doi timpi: întîi mai ușor cu mîna apoi complet cu cheia. Se deschide robinetul de vapori, pentru evacuarea aerului x) și sursa de căldură. Apa începe să fiarbă, iar vaporii cu aerul din interior vor ieși prin robinet în jet discontinuu. Un jet continuu de vapori semnalează

---

x) Prezența aerului în interiorul cazanului denaturează valorile indicate de manometru (de ex. presiunea de 1 atmosferă este atinsă înaintea temperaturii de 121°C); de asemenea sterilizarea poate fi compromisă deoarece aerul formează pungi la nivelul dopurilor de vată, în interiorul lichidelor, care împiedică difuziunea căldurii umede.

Scanned with OKEN Scanner

că aerul a fost evacuat complet şi se închide robinetul. Din acest moment presiunea în autoclav creşte; cînd acul manometrului indică presiunea de 1 atmosferă se reglează sursa de căldură pentru a se menţine această presiune constantă timp de 30 minute. Sterilizarea fiind terminată se îndepărtează sursa de căldură, se aşteaptă revenirea acului manometric la 0°C, se deschide robinetul de vapori, apoi capacul şi se scot materialele din interior. Deschiderea aparatului înainte ca presiunea să fi coborît la 0°C determină intrarea în fierbere a lichidelor şi aruncarea dopurilor prin decompresiune bruscă, compromiţînd astfel sterilizarea. Dacă se va întîrzia cu deschiderea autoclavului, apa de condensare umezeşte dopurile şi ambalajele, sterilitatea materialelor nemaifiind asigurată.

Un alt tip de autoclav este <u>autoclavul vertical</u>, <u>cu perete dublu</u>, la care vaporii provin din afara cazanului de sterilizare, apa fiind situată la partea inferioară a aparatului între cei doi pereţi (fig.9). Acest sistem permite ca, după terminarea sterili-

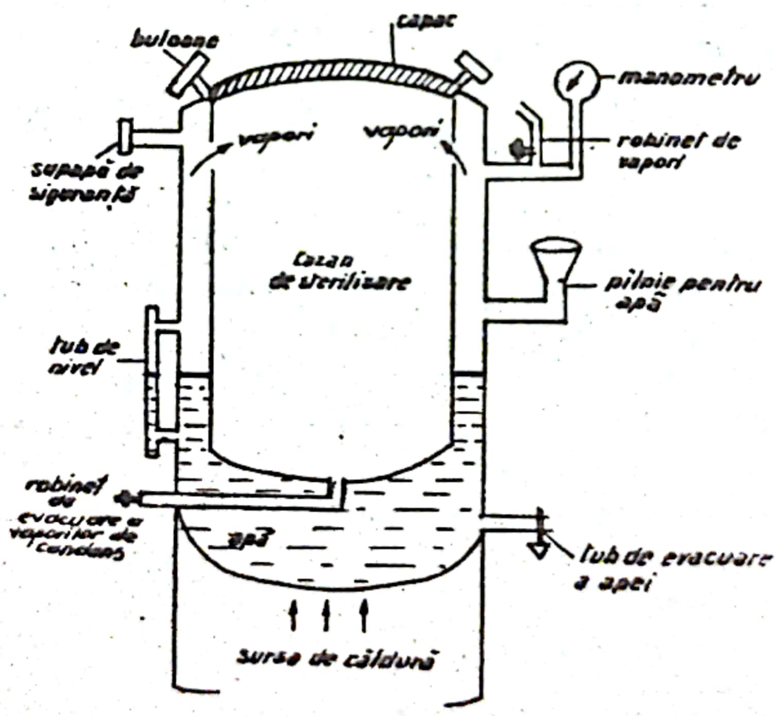


Fig. 9 Autoclav vertical cu perete dublu (schematizare)

zării, materialele să nu mai fie expuse acţiunii vaporilor de apă, uscîndu-se astfel mai rapid şi complet. De aceea autoclavul vertical cu perete dublu poate fi folosit şi pentru sterilizarea a-

biectelor din bumbac şi a instrumentarului metalic.

Pentru sterilizarea instrumentarului stomatologic, de mică chirurgie şi a seringilor Record se poate folosi <u>autoclavul orizontal, cu perete dublu</u> la care cazanul de sterilizare este situat orizontal; el funcţionează după acelaşi principiu ca şi autoclavul vertical cu perete dublu, ceea ce asigură uscarea rapidă a materialelor (fig.10).

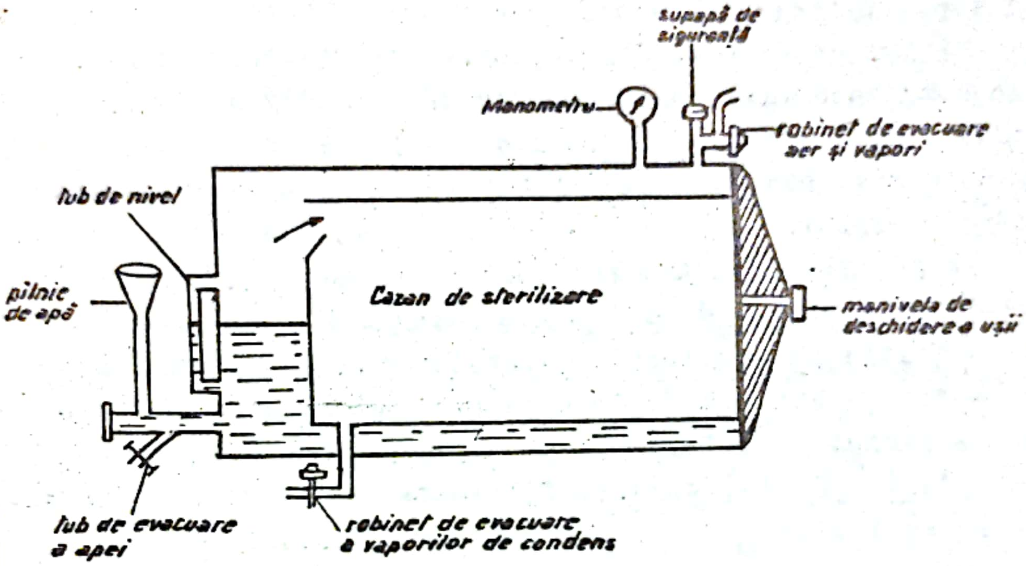


Fig. 10 Autoclav orizontal cu perete dublu (schematizare)

La blocurile de sterilizare din spitale, policlinici, se folosesc autoclave orizontale mari, cu sisteme de prevacuum şi vacuum, ceea ce permite îndepărtarea rapidă a aerului din cazanul de presiune şi penetraţia foarte bună a vaporilor de apă în porozităţile materialelor de sterilizat; de asemenea eliminarea rapidă a vaporilor de condens şi uscarea perfectă a obiectelor.

• <u>Tyndallizarea</u> este o metodă de sterilizare fracţionată sau discontinuă care se realizează la temperaturi variind între 56°-100°C. Ea se aplică produselor termolabile (produse biologice, medicamente, alimente etc.) şi constă în încălzirea acestora la baie de apă, timp de 30-60 minute, 3-6 zile succesiv. In intervalele dintre încălziri, recipientele cu produsul de sterilizat sînt menţinute la temperatura camerei (20-22°C), iar după ultima încălzire la 4°C.

Scanned with OKEN Scanner

Metoda tyndallizării, deşi foloseşte temperaturi < 100°C, asigură şi distrugerea sporilor deoarece aceştia se transformă între două încălziri succesive în forme vegetative care vor fi omorîte la o nouă încălzire.

b. <u>Sterilizarea prin filtrare</u>

Prin filtrare se înţelege trecerea fluidului de sterilizat printr-o substanţă poroasă. Reţinerea microorganismelor are loc atît în mod mecanic, cît şi printr-un fenomen de adsorbţie la nivelul capilarelor porilor filtrului.

Filtrarea este indicată pentru sterilizarea lichidelor care conţin substanţe alterabile prin căldură (medii de cultură speciale, medicamente, lichide biologice etc.), pentru separarea exotoxinelor de corpii microbieni, a virusurilor de bacterii, pentru sterilizarea aerului.

In raport cu natura substanţei poroase, filtrele folosite în bacteriologie sînt de mai multe categorii:

- <u>filtre Chamberland</u>, confecţionate din porţelan ars;
- <u>filtre Berkefeld</u>, la care substanţa poroasă este constituită din pămînt de infuzorii;
- <u>filtre Seitz</u>, discuri filtrante confecţionate din azbest impregnat cu caolin;
- <u>filtre Schott</u>, confecţionate din sticlă poroasă.
- <u>filtre Millipore</u>, membrane din acetat de celuloză.

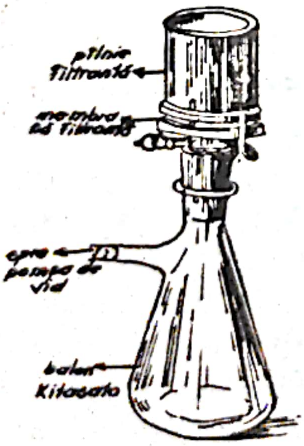


Fig. 11 Aparat de Filtrare Seitz.

Filtrele sînt marcate în raport cu dimensiunile porilor. Filtrele cu diametrul porilor de 0,5 µm reţin toate bacteriile.

Operaţia filtrării se efectuează prin presiune negativă (aspiraţie cu ajutorul unei pompe de vid) sau pozitivă. Pentru aceasta, filtrele se montează la diferite dispozitive de filtrare (fig.11).

c. <u>Sterilizarea prin radiaţii</u>

<u>Razele gamma</u> emise de cobalt 60, cu mare penetrabilitate, se utilizează pentru sterilizarea industrială a instrumentarului medical (ex. seringi) şi a unor medicamente.

2. Sterilizarea chimică

In general, sterilizarea chimică are utilizare limitată în practica medicală.

Dintre substanţele chimice cu aplicaţii în stomatologie menţionăm soluţia apoasă 2% de glutaraldehidă şi soluţie alcoolică 8% de formaldehidă folosită la sterilizarea cateterelor de polietilen pentru canalele salivare. De asemeni, oxidul de etilen este indicat pentru sterilizarea unor piese de mînă ale unit-ului dentar care nu pot fi autoclavate, obiecte din cauciuc, plastic.

3. Controlul eficienţei sterilizării

Controlul eficienţei sterilizării se face prin indicatori fizici, chimici şi biologici.

I n d i c a t o r i i f i z i c i, termometre, manometre, termografe etc., controlează dacă a fost atinsă temperatura necesară sterilizării şi dacă ea este uniformă la toate nivelele.

I n d i c a t o r i i c h i m i c i sînt constituiţi de substanţe cu punct de fuziune apropiat de temperatura la care se face sterilizarea. De ex. pentru poupinel se poate folosi zaharoza care se caramelizează la 170°C iar pentru autoclav floarea de sulf cu punct de topire la 115°C, acidul benzoic cu punct de fuziune la 120-121°C; tuburi mici din sticlă conţinînd substanţa chimică respectivă se introduc în interiorul aparatului la diferite etaje.

Indicatorii fizici şi chimici, cu excepţia termografelor, au valoare orientativă deoarece nu permit aprecierea timpului cît s-a menţinut temperatura de sterilizare.

I n d i c a t o r i i b i o l o g i c i apreciază eficienţa sterilizării prin efectuarea unui control bacteriologic indirect sau direct.

• Controlul bacteriologic indirect constă în cercetarea prezenţei florei microbiene pe obiectele sterilizate. Se recomandă prelevarea mai multor probe prin ştergerea instrumentarului în condiţii aseptice cu un tampon de vată steril, îmbibat în soluţie salină izotonă, tampon care se însămînţează pe medii de cultură aerobe şi anaerobe; obiectele mici sau alte materiale (ace de seringă, fire de sutură, meşe etc.), se manipulează aseptic şi se introduc în tuburi cu bulion. Sterilizarea se consideră efici-

entă dacă mediul de cultură rămîne steril după trei zile de menținere la termostat.

• Controlul bacteriologic direct, metoda cea mai fidelă, utilizează fire din bumbac impregnate cu microbi sporulați (*Bacillus stearothermophilus*), care sînt introduse în tuburi mici de sticlă și apoi plasate în aparat la diferite nivele. După terminarea sterilizării se verifică viabilitatea sporilor prin însămînțarea acestora într-un tub cu bulion; sterilizarea este eficientă dacă cultura rămîne negativă.

Pentru controlul sterilizării la autoclav, Institutul Cantacuzino București livrează produsul „Stearatest 120" sub formă de fiole care conțin o suspensie de spori de *B.stearothermophilus* în soluție nutritivă cu un indicator de pH; conținutul fiolelor este limpede și de culoare violet. După terminarea sterilizării, fiolele sînt introduse 24 ore la termostat pentru a vedea dacă sporii au fost distruși (menținerea nemodificată a culorii și transparenței mediului) sau sterilizarea a fost incorectă (virajul în galben a mediului, cu sau fără opacifiere).

Controlul eficienței decontaminării unor soluții sterilizate prin tyndallizare sau filtrare se face prin însămînțarea acestora pe medii de cultură adecvate.

B. DEZINFECTIA

Dezinfecția include metodele fizice și chimice prin care se realizează omorîrea microbilor în formă vegetativă și uneori și a sporilor de pe corpurile neanimate.

1. Dezinfecția prin agenți fizici

a. Dezinfecția prin fierbere

Fierberea poate fi utilizată pentru dezinfecția instrumentarului de mică chirurgie și a seringilor numai în caz de urgență sau cînd nu dispunem de altă posibilitate de sterilizare. Obiectele x) se așează într-un fierbător electric (confecționat din tablă inoxidabilă sau emailată) pe un grătar; se adaugă apă distilată în cantitate suficientă pentru a acoperi materialele pe toată durata operației.

---

x) In cazul seringilor, în fierbător se introduce și o pensă necesară pentru montarea în mod aseptic a pistonului la corpul seringii și adaptarea acelor.

Fierberea durează 30 minute, interval în care este interzisă introducerea de alte obiecte în fierbător. In momentul terminării fierberii, grătarul se ridică aseptic cu ajutorul unor cîrlige, flambate în prealabil. Se scurge apa din fierbător, se așează grătarul la locul său și se așteaptă uscarea și răcirea materialelor, urmînd a fi folosite imediat.

Punctul de fierbere al apei (100° C) poate fi ridicat cu aproximativ 3-4°C prin adăugarea carbonatului de sodiu în concentrație de 1-2%.

b. <u>Dezinfecția prin radiații</u>

<u>Razele ultraviolete</u> (RUV) au o penetrabilitate redusă, de aceea sterilizează numai corpurile transparente care permit trecerea lor. Se folosesc în mod obișnuit pentru dezinfecția aerului din încăperi (boxe de lucru, săli de operație, cabinete stomatologice, etc.) și a suprafețelor netede de lucru (mese de laborator, farmacie); în acest ultim caz deoarece RUV sînt practic ineficace asupra peliculelor de substanțe organice, suprafețele vor fi în prealabil curățate și dezinfectate cu agenți chimici.

Ca surse artificiale de RUV se folosesc lămpile cu vapori de mercur; efectul bactericid al radiațiilor se exercită în zona lungimilor de undă cuprinse între 240-280 nm și pînă la distanța de 1-1,5 m de sursa de radiații.

c. <u>Dezinfecția prin ultrasunete</u>

Ultrasunetele se obțin prin trecerea unui curent electric alternativ de înaltă frecvență printr-un cristal de cuarț; propagarea ultrasunetelor într-un mediu apos determină dezintegrarea rapidă a celulelor bacteriene prin spargerea peretelui celular (fenomen de cavitație).

Ultrasunetele se folosesc în practica medicală pentru curățirea și dezinfecția instrumentarului chirurgical, inclusiv a celui stomatologic (ultrasonare în băi cu soluții de detergenți).

2. <u>Dezinfecția prin agenți chimici</u>

Dezinfecția chimică este larg utilizată atît în laboratorul de microbiologie cît și în activitatea practică a unităților sanitare, alimentare, locuințelor etc. pentru:

- dezinfecția meselor de lucru, dușumelelor, mobilierului, veselei, lenjeriei etc. (cloramină 5%, acid fenic 5%, Tego 103 G 2-5% etc.);

- dezinfecţia seringilor şi a instrumentarului chirurgical (bromocet 2%);

- dezinfecţia pipetelor Pasteur şi gradate, a lamelor (cloramină 5%, amestec sulfocromic etc.).

In cabinetul stomatologic se va dezinfecta zilnic fotoliul dentar, în special tetiera, braţele fotoliului şi măsuţa de instrumente. Diversele piese ale unit-ului dentar, cum sînt seringa de apă şi aer vor fi şterse cu un burete îmbibat în clorhexidină soluţie 5% în alcool de 70°. Oxicianura de mercur în soluţie apoasă 1/500 se foloseşte pentru dezinfecţia unor obiecte din cauciuc: sonde, tuburi de dren, diga x) etc.

C. ANTISEPTIZAREA

Antiseptizarea este operaţia prin care se realizează omorîrea microbilor în formă vegetativă de pe învelişurile organismului (tegument, mucoase) şi din plăgi supurate, folosind substanţe chimice - antiseptice.

Soluţiile de alcool 70%, bromocet 1‰ sau cloramină 1% sînt utilizate curent pentru antiseptizarea mîinilor.

Redăm cîteva din aplicaţiile practice ale antisepticelor în stomatologie:

- antiseptizarea mucoasei bucale cu apă oxigenată 3%, alcool-iodat 2%, clorhexidină soluţie apoasă 0,2 %, acid peracetic soluţie 0,2% în etanol 33%;

- antiseptizarea canalelor radiculare cu fenol inclus în soluţiile Bonain, Walkhoff şi Chlumsky, cloramină soluţie 3%, hipoclorit de sodiu soluţie 5%;

- antiseptice utilizate în componenţa pastelor de obturaţie radiculară (ex. eugenol, timol, cloroform), a amalgamelor dentare (ex. argint, mercur, cupru), a pastelor de dinţi şi apelor de gură (ex.hexaclorofen, eugenol, timol).

---

x) Cîmp din cauciuc utilizat pentru izolarea dintelui.

II. MASURI DE PROTECTIE IN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE SI METODICA LUCRULUI ASEPTIC

A. MASURI DE PROTECTIE

Pentru prevenirea contaminării persoanelor care lucrează în laboratorul de microbiologie cît şi a mediului înconjurător cu microbi din materialul infecţios (produse patologice, culturi microbiene etc.), precum şi pentru a evita suprainfectarea produselor patologice cercetate cu microorganisme provenite din mediul extern (aer, de pe suprafeţe etc.) sau de la manipulator (de pe tegumente, picături Pflügge x)) etc.) sînt necesare o serie de măsuri de protecţie:

1. în camerele de lucru se va purta obligator halat, bonetă şi,după caz, mască, mănuşi, ochelari de protecţie;

2. pe masa de lucru nu vor fi admise alte obiecte (serviete, cărţi, haine), nu se mănîncă şi nu se fumează în laborator;

3. atît produsele microbiene cît şi materialul steril vor fi manipulate în condiţii aseptice xx) sub protecţia flăcării şi la adăpost de curenţii de aer (uşile şi ferestrele închise, preferabil boxe sterile);

4. dacă se sparge sau se varsă conţinutul unui recipient cu produs microbian se va face imediat dezinfecţia suprafeţei contaminate acoperind-o cu o soluţie de cloramină 5% sau acid fenic 5% care se menţine 1-2 ore; halatele contaminate se autoclavează;

5. ori de cîte ori se atinge un material infecţios este obligatorie spălarea mîinilor cu apă şi săpun şi antiseptizare cu soluţie de cloramină 1% sau bromocet 1‰;

---

x) Picături de secreţii naso-oro-faringiene

xx) Complex de măsuri şi metode prin care un produs, obiect sau organism sînt protejate de contaminarea cu microbi.

6. nu se părăsește laboratorul cu îmbrăcămintea de lucru.

B. METODICA LUCRULUI ASEPTIC

Metodica lucrului aseptic aparține nu numai laboratorului de microbiologie ci se extinde la întreaga activitate medicală, fiind unul din mijloacele cele mai eficiente pentru prevenirea intercontaminărilor (bolnav-bolnav, personal medical-bolnav) posibile în unitățile sanitare.

Etapele unei manipulări aseptice a produselor microbiene (produse patologice, culturi).

1. Ansa bacteriologică se ține în mîna dreaptă ca un creion, cît mai aproape de extremitatea opusă celei care se introduce în recipient. Se sterilizează la flacără, menținînd-o într-un prim timp în poziție verticală și apoi orizontal. Recipientul (eprubetă, balon etc.) din care se prelevă sau în care se introduce produsul se ține în mîna stîngă de extremitatea inferioară, pentru ca întreaga operație de manipulare să se efectueze sub controlul vederii (fig.12, a, b).

2. Se scoate dopul recipientului, menținîndu-l între auricular și palma mîinii drepte și apoi se sterilizează prin flambare gîtul și orificiul acestuia (fig.12, c).

3. Se prelevă sau se depune cu ansa (pipeta) materialul infecțios în recipient, evitînd atingerea pereților și mai ales a orificiului acestuia (fig.12, d).

4. Se flambează din nou gura și gîtul recipientului prin rotire în flacără timp de cîteva secunde și apoi se introduce dopul de vată (fig.12, e, f).

5. Ansa se sterilizează la flacără prin mișcări succesive (introducere și scoatere din flacără), pentru a nu se creia aerosoli contaminanți în jur, apoi se repune în stativ vertical și cu bucla în sus (fig.12, g). Pipetele folosite se introduc într-un vas cilindric cu soluție dezinfectantă (acid fenic 5%), care se găsește obligator pe fiecare masă de lucru.

6. Recipientele, eprubetele, cutiile Petri etc. după întrebuințare se așează în găleata cu material infecțios, în vederea sterilizării la autoclav.

Scanned with OKEN Scanner

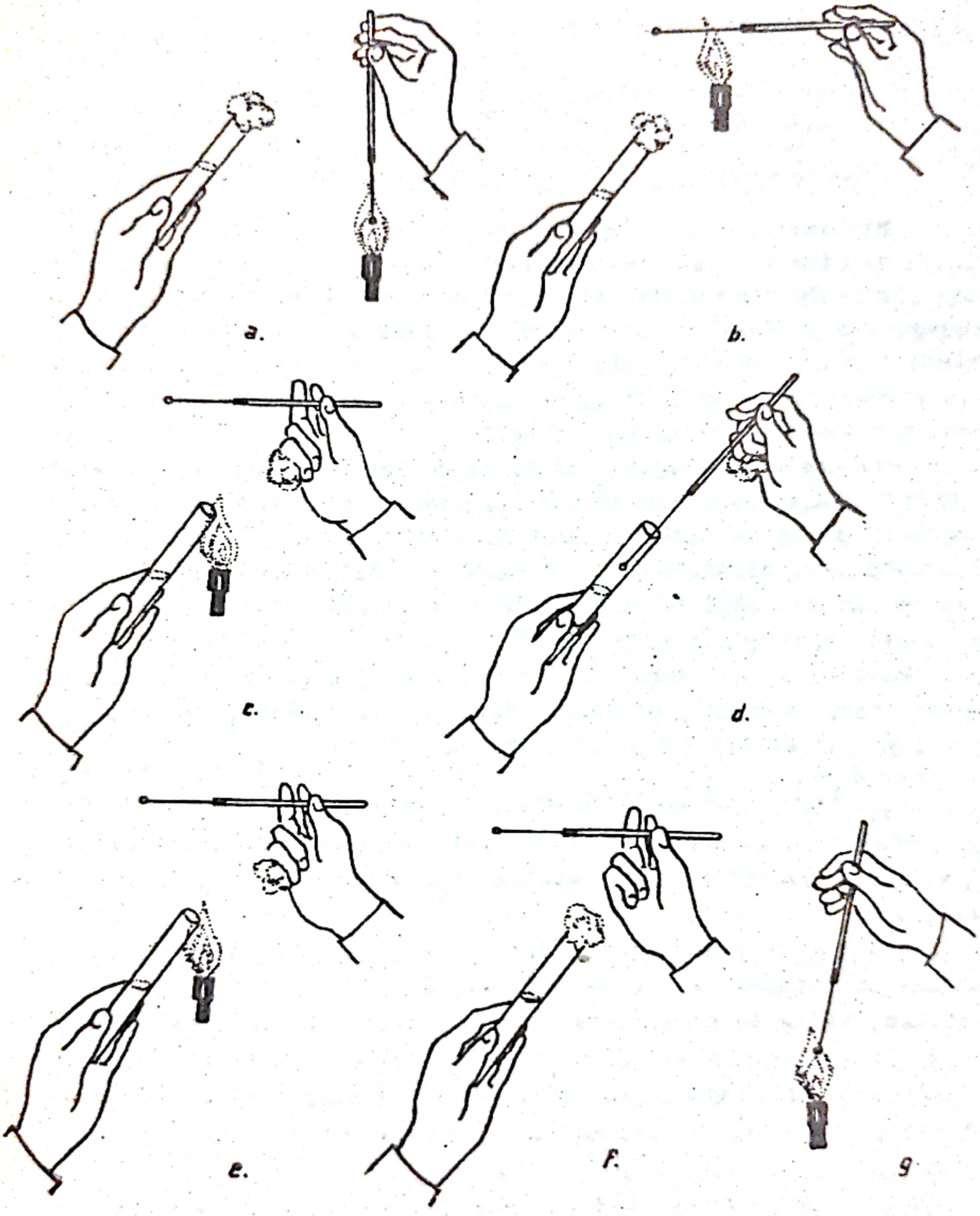


Fig. 12 Aspecte ale metodicii lucrului aseptic.

Scanned with OKEN Scanner

III. RECOLTAREA SI TRANSPORTUL PRODUSELOR PATOLOGICE

Diagnosticul etiologic al unei infecţii prin metode bacteriologice (izolarea şi identificarea bacteriei cauzale) depinde în mare măsură de respectarea riguroasă a condiţiilor de recoltare şi transport a produselor patologice. Deoarece nu se poate efectua un examen bacteriologic de calitate pe un produs incorect recoltat, prelevarea produselor patologice trebuie să constituie un act medical organizat şi controlat de medic.

Produsele patologice pot fi reprezentate de umori, secreţii şi excreţii ale organismului care prezintă modificări citologice, chimice şi bacteriologice în urma îmbolnăvirii (ex. sînge, lichid cefalorahidian, urină, materii fecale) sau de produse care apar numai în caz de boală, ca răspuns al organismului faţă de infecţie (ex. puroi, spută, lichid pleural).

Probele supuse unui examen bacteriologic pot proveni de la bolnavi, convalescenţi, purtători sănătoşi de germeni, cadavre sau din mediul extern (apă, alimente, aer, sol).

A. PRINCIPII GENERALE DE RECOLTARE SI TRANSPORT

Pentru obţinerea unui produs patologic valoros pentru diagnosticul unei infecţii este necesară respectarea următoarelor principii:

1. Alegerea produsului patologic cel mai reprezentativ, cu semnificaţie etiologică, cunoscînd localizarea infecţiei, poarta de intrare, căile de diseminare şi de eliminare a bacteriei infectante din organism. De ex. sputa şi sîngele în pneumonia pneumococică, lichidul cefalorahidian în meningita meningococică, tuberculoasă etc.; exsudatul faringian în angina difterică, streptococică etc.

2. Cunoaşterea tehnicii corecte de recoltare şi a momentului cel mai potrivit pentru prelevarea fiecărui produs (ex. în fe-

bra tifoidă hemocultura se va practica în primele două săptămîni de boală).

3. Recoltarea produselor patologice să fie efectuată înainte de aplicarea oricărui tratament antimicrobian local sau general. Dacă tratamentul a început, recoltarea se va face la 24-48 ore de la întreruperea sa. In cazul în care gravitatea bolii nu permite întreruperea terapiei se va specifica în buletinul de trimitere a produsului medicamentul şi doza folosită.

4. Recoltarea produselor să se facă numai cu material sterilizat prin agenţi fizici şi respectînd regulile de asepsie şi antisepsie. In acest mod se previne atît contaminarea probelor în timpul prelevării şi transportului cît şi infectarea pacientului în cursul manevrelor de recoltare, precum şi a persoanelor care manipulează produsul microbian.

5. In cazul produselor cu floră de asociaţie bogată (ex. materiile fecale) recoltarea se va face în lichide conservante x).

6. Probele recoltate vor fi etichetate cu numele şi prenumele bolnavului, denumirea produsului, data recoltării şi însoţite de un buletin de analiză care cuprinde mai detaliat informaţiile necesare privind bolnavul (nume, prenume, vîrstă, adresă, diagnostic prezumtiv, precizări asupra unei eventuale antibioterapii anterioare recoltării) şi produsul patologic (natura probei, data şi ora recoltării); de asemenea se notează pe buletin examenul solicitat şi numele persoanei care a recoltat şi expediat produsul. Toate aceste informaţii sînt deosebit de utile microbiologului în alegerea metodelor de lucru adecvate şi interpretarea rezultatelor obţinute.

7. Produsele recoltate vor fi imediat expediate la laborator pentru a evita alterarea cantitativă şi calitativă a florei microbiene patogene.

Pentru bacteriile cu vitalitate redusă (ex. meningococ, gonococ) este indicată însămînţarea extemporanee a produselor pe medii de cultură preîncălzite la 37°C.

Produsele destinate izolării microbilor strict anaerobi vor fi transportate direct în seringa cu care s-a efectuat recoltarea,

---

x) Soluţii care prin conţinutul lor în substanţe bacteriostatice inhibă dezvoltarea microbilor de asociaţie permiţînd supravieţuirea germenilor patogeni.

după ce au fost eliminate eventualele bule de aer iar acul a fost fixat într-un dop de cauciuc steril - procedeul „seringă anaerobă".

8. Dacă intervalul dintre recoltarea şi examinarea produselor depăşeşte 1-2 ore este necesară refrigerarea probelor la 4°C.

9. In cazul expedierii probelor la distanţă se vor utiliza medii de transport sau de îmbogăţire care asigură supravieţuirea şi chiar multiplicarea bacteriilor patogene; uneori sînt necesare condiţii de refrigerare la 0°C (recipientul cu produs este plasat într-un amestec de ghiaţă cu sare).

Transportul probelor se va face prin curier special, în recipiente bine închise, protejate de cutii din lemn sau metal, specificîndu-se pe ambalaj „material infecţios".

In alegerea metodelor de recoltare, conservare şi transport a produselor patologice, a tehnicilor de prelucrare bacteriologică, cît şi pentru interpretarea rezultatelor privind implicarea etiologică a bacteriei sau bacteriilor izolate este necesar să se ţină seama de natura produsului în momentul prelevării sale. Din acest punct de vedere se diferenţiază:

- produse patologice necontaminate (ex. sînge, lichid cefalorahidian, exsudate din cavităţi seroase, puroi din colecţii închise). Ele sînt recoltate prin puncţie din zone normal sterile ale organismului;

- produse patologice care se contaminează în cursul eliminării din organism cu microbiota indigenă a traiectelor de eliminare (ex. urina, sputa);

- produse patologice contaminate (ex. materii fecale, exsudat nasofaringian, puroi din plăgi, arsuri, secreţii vaginale). Ele provin din zone ale organismului normal colonizate cu microbi.

B. METODE DE RECOLTARE A PRODUSELOR PATOLOGICE

1. Sîngele

Recoltarea sîngelui pentru examene bacteriologice este indicată atunci cînd se bănuieşte prezenţa microbilor în circulaţia sangvină: bacteriemii, septicemii x).

---

x) Bacteriemia = prezenţa tranzitorie şi în număr mic a bacteriilor în sînge mobilizate dintr-un focar infecţios sau de la nivelul unei mucoase lezate. Septicemia = infecţie generalizată caracterizată prin prezenţa persistentă a bacteriilor în sînge consecutiv descărcării masive, continui sau repetate, a bacteriilor dintr-un focar infecţios (focar septicemic)

Evidențierea bacteriilor în sînge se face în mod curent prin hemocultură = însămînțarea sîngelui pe medii de cultură.

a. Indicațiile hemoculturii

Hemocultura are numeroase indicații din care amintim pe cele mai importante: sindrom septicemic, infecții bacteriene sistemice (ex. febră tifoidă, pestă), endocardita bacteriană subacută, bacteriemii după diferite instrumentații (la nivelul cavității bucale, a căilor urinare, cateterisme venoase prelungite), sau în cursul unor infecții (ex. pneumonii pneumococice, meningite meningococice) etc.

b. Condițiile de recoltare și însămînțare a sîngelui

i. Hemocultura se va practica înainte de începerea tratamentului antimicrobian. Dacă tratamentul a fost deja instituit iar starea bolnavului nu permite întreruperea sa este necesar să se adauge la mediul de cultură substanțe care să neutralizeze acțiunea medicamentului [x].

ii. Momentul recoltării. La bolnavii cu febră continuă, hemocultura se poate practica imediat după internare. La bolnavii cu febră discontinuă, momentul recoltării va coincide cu apariția frisonului sau a croșetului febril [xx].

iii. Numărul recoltărilor. Pentru a surprinde prezența microbilor în sînge sînt de obicei necesare mai multe hemoculturi. Astfel în septicemii se recomandă efectuarea a 3 hemoculturi la 1/2 oră interval, în timp ce în endocardita subacută se vor practica 5 pînă la 10 hemoculturi în decurs de 24-48 ore. Repetarea hemoculturilor este de asemenea indicată în cazul izolării unui microb condiționat sau accidental patogen (ex. *Staphylococcus epidermidis*) în vederea implicării sale etiologice.

---

[x] Acid paraaminobenzoic 1 ml sol. 0,1% la 1000 ml mediu, în cazul terapiei cu sulfamide; penicilinază, o fiolă de 40 U produs liofilizat sau 1-2 ml produs nativ (filtrat de cultură de 5-6 zile de colibacil) la 100 ml mediu, pentru inactivarea penicilinei; cisteină, 5-6 mg pentru fiecare 100 mg streptomicină administrată. Un inactivator foarte bun al antibioticelor aminoglicozidice și polimixinelor este polianetolsulfonatul de sodiu, utilizat în concentrație de 0,025-0,05 g la 100 ml mediu; el are în același timp o acțiune anticoagulantă, antifagocitară și de diminuare a efectului bactericid al sîngelui prin activitatea sa anticomplementară și față de lizozim.

[xx] Frisonul și febra apar după aproximativ 1-2 ore de la pătrunderea microbilor în sînge.

Scanned with OKEN Scanner

iv. <u>Cantitatea de sînge recoltată</u>. De obicei se recoltează 10-15 ml sînge care se însămînțează direct la patul bolnavului într-o cantitate de mediu de 10-15 ori mai mare pentru a-i anihila acțiunea antibacteriană naturală.

v. <u>Mediile de cultură folosite</u>. Hemocultura se practică de obicei pe medii lichide, utilizînd în paralel un mediu pentru izolarea bacteriilor aerobe și facultativ anaerobe, ex. bulion infuzie cord-creier glucozat 2‰ și un mediu pentru izolarea anaerobilor, ex. bulion VF x) cu acid thioglicolic și albastru de metilen, în prealabil regenerat prin fierbere.

c. <u>Materialul necesar</u>:

- seringă sterilă de 20 ml, preferabil în întregime din sticlă, gata montată, tip Luer, cu 1-2 ace de rezervă;
- casoletă cu măști, batiste din tifon și tampoane de vată sterile;
- pensă sterilă;
- flacoane cu bromocet 1%, alcool-iodat 2% și eter;
- spirtieră, garouri;
- medii de cultură: un balonaș cu 100 ml bulion infuzie cord-creier și o eprubetă mare (25/250 mm) cu 50 ml bulion VF xx).

d. <u>Tehnica hemoculturii</u>

Recoltarea sîngelui se face de obicei din venele de la plica cotului, bine evidențiate prin așezarea bolnavului cu brațul sprijinit comod pe marginea patului sau pe spătarul unui scaun (sub braț se introduce un sul de vată învelit în mușama).

Persoana care efectuează hemocultura își va spăla mîinile cu apă caldă și săpun (folosind eventual o perie) și apoi le va usca cu o batistă sterilă din tifon. Este indicată folosirea măștii și a bonetei care să acopere bine părul. In timpul practicării hemoculturii nu se vorbește și nu se circulă prin cameră.

Se antiseptizează pielea bolnavului în regiunea care va fi puncționată, mai întîi cu un tampon de vată îmbibat cu bromocet 1% și apoi cu alcool-iodat 2%; după aproximativ 2-3 minute se îndepărtează iodul prin ștergere cu eter și apoi se aplică garoul extrăgîndu-se, fără a mai palpa vena, 10-15 ml sînge. Se desface

---

x) VF = Viande (carne), Foie (ficat)

xx) Cînd se urmărește izolarea unui anumit microb se pot folosi medii speciale: ex. bulion-bilă pentru bacilul tific, Sabouraud lichid pentru fungi etc.

Scanned with OKEN Scanner

garoul şi se retrage acul din venă, se realizează hemostaza cu un tampon de vată recomandînd bolnavului să flecteze braţul.

Se schimbă rapid acul seringii cu un alt ac de rezervă folosind pensa sterilă şi apoi se însămînţează sîngele recoltat, sub protecţia flăcării, în cele două medii de cultură lichide, respectînd proporţia de 1/10 între sînge şi mediu; după însămînţare, recipientele se agită uşor, circular (în cazul eprubetei cu mediu anaerob, omogenizarea conţinutului se va face prin rulare între palme), pentru a împiedica coagularea sîngelui.

Toate mediile însămînţate se transportă imediat la laborator pentru incubare la termostat, la 36-37°C.

2. Lichidul cefalorahidian

a. Indicaţii de recoltare

Examenul bacteriologic al lichidului cefalorahidian (l.c.r) se practică ori de cîte ori manifestările clinice ale bolii indică o infecţie a meningelui - meningită.

b. Condiţii de recoltare

Recoltarea l.c.r. se face în mod obişnuit prin puncţie lombară. Bolnavul este culcat în decubit lateral la marginea patului sau în poziţie şezîndă, cu capul şi genunchii flectaţi pentru a se evidenţia cît mai bine spaţiile intervertebrale. Se reperează spaţiul dintre L_4-L_5 (intersecţia liniei care uneşte marginea superioară a celor două creste iliace) unde nu mai există pericol de înţepare a măduvei. După pregătirea mîinilor operatorului şi a tegumentului bolnavului ca mai sus (vezi hemocultura) se face puncţia pe linia mediană, cu acul orizontal, pătrunzîndu-se în spaţiul subarahnoidian; în acest moment se retrage mandrenul. Lichidul se recoltează, în cantitate de 4-6 ml, în 2 tuburi de centrifugă sterile. Se scoate acul, se badijonează locul puncţiei cu alcool; bolnavul rămîne culcat cu faţa în sus, fără pernă, cîteva ore.

L.c.r. normal este clar şi incolor ca apa de izvor; în caz de meningită el poate fi, în funcţie de agentul etiologic: clar sau opalescent (meningită tuberculoasă, virală), opalescent sau purulent (meningită meningococică, pneumococică).

c. Transport

Transportul l.c.r. la laborator se va face imediat după

recoltare, în cutie izotermă la 37°C, pentru a fi examinat fără întîrziere din punct de vedere bacteriologic, citologic și biochimic.

Pentru lichidele purulente în care se bănuiește prezența bacteriilor cu rezistență redusă în mediul extern (ex. meningococ) este indicat ca însămînțarea să se practice extemporaneu pe medii în prealabil încălzite la 37°C.

3. <u>Exsudatele purulente</u>

a. <u>Indicații de recoltare</u>

Exsudatele purulente reprezintă un produs patologic frecvent investigat din punct de vedere bacteriologic deoarece procesele supurative pot avea localizări foarte variate: la nivelul tegumentului și țesuturilor subjacente (foliculite, panariții, abcese, flegmoane etc.), la nivelul mucoaselor (conjunctivite, parodontite, stomatite, uretrite etc.), a cavităților seroase (pleurezii, peritonite), localizări ganglionare (adenite), osoase (osteomielite), viscerale (abces pulmonar, hepatic, renal).

Colecțiile purulente pot fi închise și deschise.

b. <u>Metode de recoltare</u>

i. <u>Recoltarea puroiului din colecții închise</u>:

- în colecții superficiale (vezicule, pustule), prelevarea se poate face cu pipeta Pasteur, după o prealabilă antiseptizare a regiunii puncționate cu alcool-iodat 2%;

- în colecții purulente mai profunde (abcese, flegmoane, furuncule, precum și în pleurezii), recoltarea se efectuează prin puncție cu o seringă sterilă și un ac gros, după antiseptizarea tegumentului cu alcool-iodat.

ii. <u>Recoltarea puroiului din colecții deschise</u>:

- În cazul colecțiilor fistulizate, prelevarea se poate face prin aspirație cu seringa, după antiseptizarea tegumentului din jurul fistulei, produsul fiind recoltat cît mai aproape de baza leziunii. În unele cazuri se pot trimite la laborator înseși meșele de tifon care au servit la drenajul leziunii;

- în cazul plăgilor superficiale (chirurgicale, traumatice), a arsurilor, recoltarea se efectuează cu un tampon de vată steril, după îndepărtarea prealabilă, prin spălare cu soluție salină izotonă sterilă, a exsudatului purulent superficial care este intens contaminat.

Scanned with OKEN Scanner

Puroiul extras cu seringa sau pipeta Pasteur, ca și probele recoltate pe tampon sau meșe sînt introduse aseptic în eprubete sterile.

c. Transport

Transportul produselor la laborator se va face în cel mai scurt timp (maximum o oră). Pentru a asigura supraviețuirea bacteriilor anaerobe, eventual prezente în puroi, este necesar a folosi procedeul „seringă anaerobă" (vezi pag.20).

4. Exsudatul nasofaringian

Exsudatul nasofaringian reprezintă secreția mucoaselor acestor zone și un produs normal contaminat cu o microfloră variată.

a. Indicații de recoltare

Recoltarea exsudatului faringian, nasal sau nasofaringian este indicată, după caz, în:

- infecții ale mucoasei tractusului respirator superior: rinite, angine, rinofaringite, laringite etc., cauzate în special de comensali ai acestei mucoase și a cavității bucale;
- boli infecțioase cu poartă de intrare nasofaringiană (ex. meningita meningococică, difteria, scarlatina);
- depistarea purtătorilor de germeni (ex. streptococ piogen, stafilococ auriu, meningococ, bacil difteric).

b. Metode de recoltare

1. Recoltarea exsudatului faringian se efectuează cu un tampon de vată hidrofilă x), înfășurat pe o distanță de aproximativ 2 cm la una din extremitățile unei tije din lemn sau metal (aluminiu sau crom-nichel), cu diametrul de 2-3 mm și o lungime de 20 cm. Tamponul este introdus într-o eprubetă de sticlă, bine astupată cu dop de vată, și sterilizat la autoclav (fig.13).

Prelevarea se face înainte de toaleta gurii, gargarisme, masă sau la 3-4 ore după aceea. Bolnavul este așezat pe un scaun, cu gîtul în ușoară extensie și în fața unei surse de lumină. Pacientul deschide gura la maximum, respiră adînc, se deprimă baza limbii cu un apăsător de limbă steril, pentru a evidenția peretele posterior

x) Deoarece vata conține acizi grași nesaturați cu acțiune bactericidă se recomandă fie tratarea acesteia pentru neutralizarea inhibitorilor bacterieni (de ex. fierberea tamponului de vată, timp de 15 minute, în tampon - fosfat pH = 7,4), fie înlocuirea sa cu fibre din materiale netoxice ca alginatul de calciu.

al faringelui, amigdalele și pilierii. Cu ajutorul tamponului se șterge printr-o mișcare circulară regiunea menționată, insistîndu-se asupra zonelor de eritem, cu secreții purulente sau false membrane.

Fig. 13 TAMPON DE VATĂ PENTRU RECOLTAREA EXSUDATELOR.

Prelevarea exsudatului se va face cu atenție pentru a nu contamina tamponul cu flora microbiană a salivei sau de la nivelul limbii.

ii. Recoltarea exsudatului nazofaringian se poate face pe cale bucală sau mai bine per nazal. In primul caz tamponul, a cărui tijă a fost îndoită în unghi drept, este introdus prin gură îndărătul luetei și palatului moale, ștergîndu-se printr-o ușoară rotire peretele posterior al nazofaringelui iar în al doilea caz tamponul atinge peretele posterior al nazofaringelui prin alunecare lentă de-a lungul planșeului nazal.

iii. Recoltarea exsudatului nazal pentru depistarea purtătorilor de Staphylococcus aureus se efectuează cu ajutorul unui tampon de vată mai subțire. Prelevarea se face printr-o mișcare ușoară de rotire pe suprafața internă a mucoasei fiecărei narine.

e. Transport

Tampoanele vor fi expediate la laborator în cel mai scurt timp pentru a evita alterarea produselor consecutiv desicației sau înmulțirii florei de asociație.

In cazul în care probele nu pot fi prelucrate în interval de 1-2 ore după recoltare, tampoanele vor fi introduse în medii de transport (mediul Pike pentru streptococul piogen) și refrigerate.

Pentru izolarea meningococilor, însămînțarea exsudatului se va face imediat după recoltare.

5. Sputa

Sputa este reprezentată de secreția mucoasei căilor respiratorii inferioare (trahee, bronșii, alveole pulmonare inflamate). Ea este eliminată prin tuse, contaminîndu-se în cursul evacuării cu flora microbiană indigenă a faringelui și cavității bucale.

a. Indicații de recoltare

Recoltarea sputei este indicată în infecțiile acute și cro-

Scanned with OKEN Scanner

nice ale căilor aeriene inferioare: traheobronşite, bronşite, pneumonii, bronhopneumonii, tuberculoză pulmonară, abcese pulmonare etc.

b. Metode de recoltare

i. Recoltarea exsudatului bronhoalveolar se face în mod obişnuit prin expectoraţie spontană, după un acces de tuse. Pentru a reduce, într-o oarecare măsură, contaminarea sputei cu flora microbiană a mucoasei căilor respiratorii superioare şi salivei, se recomandă clătirea prealabilă a gurii şi gargară cu apă fiartă şi răcită. De asemenea se va instrui bolnavul cum trebuie să procedeze pentru a obţine în proba respectivă spută şi nu salivă sau secreţii nazofaringiene. Bolnavul va expectora într-un borcan de sticlă steril cu gura largă, de 150-200 ml, prevăzut cu capac.

In tuberculoza pulmonară este necesar să se recolteze cîte o probă de spută matinală 3 zile consecutiv.

ii. La persoanele cu tuse slab productivă se va recolta sputa de dimineaţă, la deşteptare, pentru a obţine în proba respectivă secreţiile bronşice acumulate în timpul nopţii; de asemenea tusea mai poate fi stimulată prin aerosolizare cu soluţie hipertonică caldă de clorură de sodiu.

iii. La copiii care nu expectorează, recoltarea secreţiilor se poate face de la nivelul faringelui posterior cu ajutorul unui tampon de vată introdus de preferinţă pe cale nasală şi lăsat pe loc în timpul tusei astfel provocată; rezultate mai concludente se obţin prin metoda tamponului laringian x).

Pentru cercetarea bacilului Koch la netuşitori se va utiliza produsul recoltat cu tamponul laringian sau cu ajutorul bronhoscopului iar la persoanele care înghit sputa prin tubaj gastric xx).

---

x) Se foloseşte un tampon steril a cărui tijă din sîrmă de aluminiu este îndoită în unghi de 120°. După umezire prealabilă cu soluţie salină izotonă, tamponul se introduce, sub controlul oglinzii laringiene, prin cavitatea bucală, pînă în laringe, fără a atinge peretele posterior al faringelui, baza limbii fiind menţinută în jos cu un apăsător de limbă. In acest moment bolnavul este îndemnat să tuşească, secreţiile eliminate depunîndu-se pe tampon.

xx) Tubajul gastric se practică dimineaţa, pe nemîncate, cu o sondă Nélaton la copii şi Einhorn la adulţi, prin care se introduc 5-10 ml şi respectiv 20-30 ml soluţie salină izotonă. Probele de spălătură gastrică vor fi imediat neutralizate cu soluţie 10% de carbonat de sodiu în prezenţa unui indicator de pH.

Toate metodele de recoltare a secrețiilor bronhopulmonare expuse mai sus nu reflectă în mod fidel flora microbiană din infecțiile tractusului respirator inferior, datorită contaminării inevitabile orofaringiene. Singurul produs bacteriologic valabil, adică care conține în mod predominant microbul infectant, este aspiratul bronșic prelevat prin puncție transtraheală subglotică, după o prealabilă anestezie locală. Aspirația transtraheală va fi efectuată de un cadru medical experimentat și este rezervată anumitor categorii de bolnavi.

c. Transport

Probele vor fi imediat transportate la laborator cînd se urmărește izolarea bacteriilor din afecțiuni netuberculoase. In caz de necesitate, produsul va fi menținut la 4°C dar nu mai mult de 1-2 ore, refrigerarea fiind nocivă pentru unele bacterii infectante (ex. Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae).

Pentru cercetarea bacilului Koch, sputa poate fi prelucrată la nevoie și după 24 ore de la recoltare dacă a fost menținută la frigider.

6. Urina

In mod normal urina vezicală este sterilă dar se contaminează în cursul micțiunii cu flora microbiană existentă în porțiunea distală a uretrei și la nivelul vulvei.

a. Indicații de recoltare

Recoltarea urinii pentru investigație bacteriologică este indicată în:

- infecții acute și cronice ale căilor urinare (cistite, pielonefrite etc.) produse cel mai frecvent pe cale ascendentă de microorganisme condiționat patogene (Escherichia coli, Klebsiella, enterococ etc.);

- infecții sistemice cu bacterii patogene ce pot determina localizări renale (ex. leptospiroză, tuberculoză) sau numai o simplă bacteriurie (ex. febra tifoidă).

b. Metode și condiții de recoltare

La femeie, recoltarea urinii se face după o toaletă riguroasă a regiunii vulvare și orificiului vaginal prin spălare cu apă și săpun, urmată de clătire abundentă și uscare cu un tifon steril; femeia va urina cu labiile depărtate.

Scanned with OKEN Scanner

La bărbat, se retractă prepuţul şi apoi se face în mod similar toaleta glandului şi a meatului urinar.

Atît la femeie cît şi la bărbat se recoltează urina eliminată spontan, din jetul mijlociu (primul jet care a spălat canalul uretral se aruncă), care se colectează direct într-un borcan steril cu gura largă, de 250-400 ml, prevăzut cu capac.

Pentru diagnosticul infecţiilor tractusului urinar cu bacterii condiţionat patogene, prelevarea urinii se va face după minimum trei ore de la micţiunea anterioară.

In anumite cazuri, pentru obţinerea unei probe de urină necontaminată se poate recurge la aspirarea acesteia direct din vezică prin puncţie suprapubiană, cu seringa, după anestezie locală.

In cazul suspectării unei tuberculoze renale se va recolta urina de dimineaţă în totalitate. Pentru a avea o cantitate mai mică de produs se recomandă bolnavului să reducă consumul de lichide în ziua care precede recoltarea. Sansele de izolare a bacilului Koch pot fi mărite prin practicarea examenului bacteriologic pe 3-4 probe recoltate la 1-2 zile interval. Dacă bolnavul efectuează un tratament cu tuberculostatice, acesta va fi întrerupt cu cel puţin 7 zile anterior recoltării.

c. Transport

Urina va fi imediat trimisă la laborator pentru a fi examinată în prima oră de la recoltare. Menţinerea sa nerefrigerată la temperatura camerei, peste acest interval de timp, va modifica rezultatul bacteriologic real al probei datorită înmulţirii marcante a florei microbiene de contaminare.

7. Materiile fecale

Materiile fecale reprezintă un produs patologic în mod normal intens contaminat cu bacterii.

a. Indicaţii de recoltare

- infecţii intestinale cauzate de bacterii patogene, unele exclusiv enterotrope (Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae) şi altele cu tropisme multiple (Mycobacterium tuberculosis, Bacillus anthracis);

- infecţii intestinale produse de bacterii condiţionat patogene care fac parte din microbiota indigenă a intestinului (ex. Escherichia coli, Staphylococcus aureus, specii de Proteus, Klebsiella);

- toxiinfecţii alimentare de etiologie variată (salmonelozică, stafilococică etc.);
- depistarea purtătorilor de enterobacterii patogene (Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae).

b. Metode de recoltare

Recoltarea probelor de materii fecale pentru examen bacteriologic se poate face din scaun sau de la nivelul rectului.

i. Recoltarea din scaun. La bolnavii diareici recoltarea se practică din scaunul emis spontan iar la purtători din scaunul purgat (pentru îndepărtarea materiilor fecale de stagnare).

Bolnavul defecă într-un vas smălţuit (oală de noapte) în prealabil fiert. Cu ajutorul unei mici spatule din lemn, sterilă, se prelevă aproximativ 2-3 g materii fecale din porţiunile cele mai caracteristice (muco-sangvinolente, mucopurulente) care se introduc în flacoane de sticlă sterile, prevăzute cu dop de cauciuc etanş, ce conţin 3-4 ml de lichid conservant (ex.soluţie salină glicerinată tamponată); în unele cazuri sînt necesare medii speciale de transport (ex. mediul semisolid Cary-Blair pentru vibrionul holeric (fig.14).

Fig.14 Colector pentru materii fecale

ii. Recoltarea de la nivelul rectului este indicată mai ales la bolnavii cu dizenterie cronică sau în caz de epidemii care necesită prelevări în masă. Ea se poate practica cu sonda Nélaton sau cu tamponul, eventual sub control rectoscopic (permite recoltarea direct din leziunile mucoasei recto-sigmoidiene). Sonda sterilă sau tamponul se umezese în soluţie salină izotonă şi apoi se introduc în rect aproximativ 15-20 cm la adult şi 8-10 cm la copil; după recoltare produsul se descarcă imediat prin agitare în recipientul cu lichid conservant sau mediu de transport.

c. Transport

Transportul la laborator al probelor cît şi prelucrarea acestora se face cît mai repede (în maximum 1 oră) deoarece unele enterobacterii patogene sînt sensibile la antagonismul exercitat de microbiota indigenă a intestinului.

Expedierea la distanţă a probelor se va face în coleetoare speciale, bine etanşeizate şi în condiţii de refrigerare.

8. Produsele buco-dentare

Recoltarea produselor de la nivelul mucoasei bucale şi a dinţilor necesită de asemenea respectarea cu stricteţe a regulilor de asepsie deoarece cavitatea bucală reprezintă, în condiţii fiziologice, un mediu intens contaminat cu o floră microbiană abundentă şi variată.

a. Recoltarea produselor în infecţii ale mucoasei bucale

Mucoasa bucală poate fi interesată în infecţii de natură bacteriană, micotică sau virală (ex. gingivita ulcerativă necrotică acută, parodontita marginală, tuberculoza bucală, sifilisul bucal, stomatita gonococică, candidozică, herpetică, stomatita veziculară cu exantem cauzată de virusurile Coxsackie, febra aftoasă).

Produsele patologice, reprezentate de secreţii din ulceraţii, lichid vezicular, false membrane, puroi din pungi parodontale etc., vor fi recoltate, după caz, cu tamponul de vată sau pipeta Pasteur sterile.

b. Recoltarea produsului din canalele radiculare

Recoltarea produsului în infecţiile pulpare se efectuează în 2 etape:

i. înainte de începerea tratamentului antimicrobian;

ii. după terminarea terapiei, pentru controlul sterilităţii canalelor radiculare în vederea obturării.

i. După o prealabilă izolare a dintelui cu rulouri de vată sterile sau cu o diga sterilă se efectuează antiseptizarea externă a acestuia cu apă oxigenată 3% şi apoi cu tinctură de iod 5%; după ce s-a uscat tinctura, suprafaţa dintelui va fi tamponată cu o soluţie sterilă de thiosulfat de sodiu 5% pentru a îndepărta tinctura de iod. Cu o pensă sterilă se aplică pe suprafaţa linguală a dintelui un mic disc din hîrtie de filtru care este apoi introdus într-o eprubetă cu bulion VF regenerat. Această probă serveşte pentru a verifica dacă decontaminarea suprafeţei dintelui s-a făcut corespunzător.

Cu o chiuretă sterilă se îndepărtează dentina cariată şi apoi se creează acces la camera pulpară reperîndu-se orificiile canalelor radiculare. După prepararea mecanică şi spălarea repeta-

ţă a canalelor cu soluţie salină izotonă sterilă, se prelevă proba pentru examen bacteriologic cu conuri din hîrtie sau meşe de vată sterile montate pe ace Miller. Conul sau meşa vor fi introduse cît mai aproape de apexul dinţilor (1/3 apicală fiind cea mai bogată în microorganisme) şi menţinute în canal 2-3 minute. Dacă există mai multe rădăcini, prelevarea se va face din toate canalele. După recoltare, conul sau meşa (în prealabil detaşată de pe acul Miller cu o pensă sterilă sau secţionată cu tot cu ac), vor fi introduse în eprubete conţinînd 2 ml bulion glucozat 2‰. Probele vor fi transportate imediat la laborator şi însămînţate pe medii solide în condiţii aerobe si anaerobe.

ii. Controlul sterilităţii canalelor radiculare se face respectînd aceleaşi reguli de asepsie şi antisepsie locală; se îndepărtează obturaţia provizorie care a asigurat etanşeitatea camerei pulpare şi apoi se spală abundent canalul cu 10 ml soluţie salină izotonă sterilă pentru a îndepărta medicamentul rezidual care poate modifica rezultatul examenului bacteriologic. Acest timp al spălării este deosebit de important în cazul utilizării antibioticelor, a căror acţiune remanentă este bine cunoscută (ex. penicilina, streptomicina pot persista în canalul radicular 4-5 zile iar cloramfenicolul pînă la 8-10 zile). După spălare, canalul este uscat cu meşe de vată sterile montate pe ace Miller. Pentru recoltare se introduc din nou în canal meşe sau conuri care se menţin 2-3 minute şi apoi sînt însămînţate pe medii de cultură adecvate, ca în prima etapă.

Culturile pentru controlul sterilităţii canalelor vor fi urmărite 48-72 ore în cazul tratamentului cu antiseptice şi 7 zile în cazul folosirii antibioticelor. Obturarea definitivă a canalelor va fi efectuată numai după obţinerea a 2 culturi negative succesive, la minimum 48 ore interval.

c. <u>Recoltarea produsului din granulomul dentar</u>

Examinarea florei microbiene din granulomul dentar se face în scop de cercetare. Granulomul dezinserat de pe dinte, cu ajutorul unui foarfece steril, se introduce într-o cutie Petri. După termocauterizarea peretelui acestuia se pătrunde cu vîrful unei pipete Pasteur sterile şi se aspiră conţinutul, făcîndu-se apoi frotiuri şi însămînţări în condiţii anaerobe.

Scanned with OKEN Scanner

9. Recoltarea salivei

Saliva poate fi prelevată, după caz, în totalitate sau de la nivelul glandei parotide.

a. Saliva totală este utilizată mai ales pentru studiul factorilor cu acţiune antimicrobiană prezenţi la acest nivel, ex. lizozim, anticorpi, inhibine; ea se recoltează dimineaţa, pe nemîncate, într-o eprubetă sterilă. Debitul salivar poate fi mărit prin mestecarea timp de 10 minute a unei bucăţele de parafină.

b. Saliva parotidiană se recoltează în afecţiuni ale glandei parotide - parotidite, de natură bacteriană sau virală.

După reperarea orificiului de deschidere a canalului Stenon (situat la nivelul celui de-al doilea premolar superior), acesta se izolează cu rulouri mici de vată sterile şi se antiseptizează cu un tampon cu apă oxigenată 2%. Se şterge apoi cu un tampon steril uscat, pentru îndepărtarea urmelor de antiseptic, după care se poate recolta saliva prin mai multe metode:

i. cu ajutorul unui tampon de vată steril care se menţine la nivelul orificiului de deschidere a canalului şi după îmbibarea acestuia cu salivă se depune într-un flacon steril;

ii. cu un ac de seringă bont care se introduce în canal pe o distanţă de 3-4 cm. După cîteva minute, la capătul din exterior al acului, apar cîteva picături de salivă care sînt recoltate într-o eprubetă sterilă; în cazul în care saliva nu curge spontan se va masa uşor glanda parotidă;

iii. folosind un dispozitiv special de absorbţie „sialo-prelevator" x).

---

x) Dispozitivul este format dintr-o ventuză mică fixată la capătul unui tub de sticlă care este racordat la o seringă sau pară de cauciuc; ventuza se fixează la orificiul canalului Stenon şi printr-o uşoară presiune negativă, realizată cu seringa sau para de cauciuc, se extrage saliva într-o eprubetă.

IV. METODE DE EVIDENTIERE A BACTERIILOR DIN PRODUSE PATOLOGICE

Evidenţierea bacteriilor din produse patologice se poate realiza prin <u>examen microscopic</u> şi prin <u>izolare</u>: însămînţarea produsului pe medii de cultură (metodă „in vitro") şi/sau inocularea la animale de laborator sensibile (metodă „in vivo").

A. EXAMENUL MICROSCOPIC

Examenul microscopic, ca primă etapă obligatorie a diagnosticului bacteriologic, evidenţiază caracterele morfologice şi de colorabilitate ale bacteriilor în produs patologic, ceea ce permite în multe cazuri orientarea rapidă a diagnosticului şi tratamentului antimicrobian.

Bacterioscopia poate fi practicată în preparat umed sau în preparat fixat şi colorat.

1. Preparatul microscopic umed

Examenul în preparat umed (în stare proaspătă) a produsului patologic permite stabilirea rapidă a morfologiei dar mai ales a mobilităţii microbilor.

<u>Efectuarea preparatului</u>. Cu o pipetă Pasteur se depune o picătură din produsul microbian în centrul unei lame curate şi subţiri (aproximativ 1 mm grosime). Cu o pensă fină se aplică deasupra picăturii o lamelă. Se usucă marginile lamelei cu o hîrtie de filtru şi apoi aceasta se fixează cu parafină topită x) folosind o pipetă Pasteur curbată la capăt.

<u>Examinarea preparatului</u> se poate face la microscopul optic, în lumină directă, sau pe fond întunecat (lumină indirectă):

---

x) Parafinarea lamelei evită deplasarea lichidului între lamă şi lamelă, ceea ce ar duce la o interpretare eronată a mobilităţii bacteriilor (deplasarea microbilor în aceeaşi direcţie); de asemenea asigură şi examinarea bacteriilor mobile anaerobe.

Scanned with OKEN Scanner

- examinarea în lumină directă se practică cu obiectiv uscat (40x), condensatorul Abbé coborît şi diafragmul microscopului închis parţial pentru ca intensitatea luminii să nu fie prea mare. Acest examen se foloseşte pentru studiul mobilităţii bacteriilor[x)] şi cercetarea granulelor din puroiul actinomicotic;

- examinarea la microscopul cu fond negru se realizează prin înlocuirea condensatorului Abbé cu un condensator cardioid sau paraboloid care prezintă central un disc opac, lăsînd transparent doar un inel circular periferic. Astfel razele de lumină străbat numai lateral, luminează preparatul şi apoi suferă o reflexie totală, nu pătrund în obiectiv (fig.15). In aceste condiţii de iluminare indirectă, cîmpul microscopic apare întunecat iar bacteriile, hematiile şi leucocitele din produs apar strălucitoare datorită reflectării pe suprafaţa lor a razelor de lumină. Microscopia pe fond negru se foloseşte în special pentru evidenţierea spirochetelor.

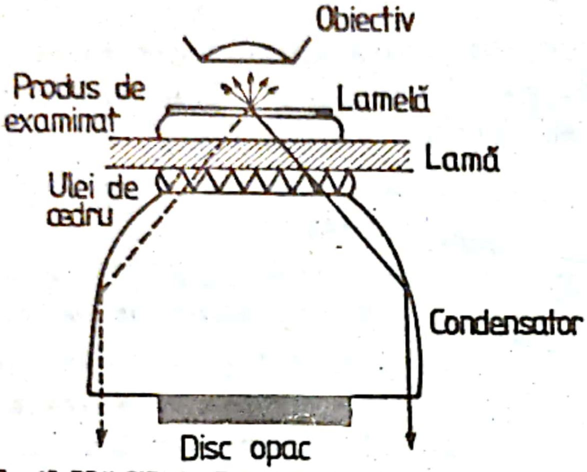


Fig.15 PRINCIPIUL EXAMINARII UNUI PREPARAT LA MICROSCOPUL CU FOND NEGRU

Pentru a pune imaginea la punct se depune o picătură de ulei de cedru pe lentila condensatorului care se ridică făcînd contact cu faţa inferioară a lamei aşezată pe platina microscopului. Folosind un obiectiv slab (10x) se centrează lumina pînă se observă un inel luminos strălucitor şi apoi se centrează condensatorul, coborîndu-l sau ridicîndu-l pînă cînd lumina apare ca un punct foarte mic strălucitor. Examinarea preparatului se face cu un obiectiv mai puternic, uscat (60x) sau cu imersie (în care caz se depune o picătură de ulei de cedru pe lamelă).

După examinare, lamele utilizate pentru preparatul umed se depun într-un cristalizor cu soluţie dezinfectantă.

2. Preparatul microscopic colorat

Preparatele colorate au cea mai largă utilizare în examenul bacteriologic, permiţînd o primă caracterizare şi grupare a bacteriilor din produs după:

[x)] Mobilitatea se apreciază observînd cel puţin 2 microbi care se deplasează în acelaşi timp în direcţii diferite.

- particularitățile morfologice (dimensiune, formă, contur, capsulă, cili, spori, granulații etc.);
- așezare (izolați, cîte doi, în grămezi, în lanțuri etc.);
- afinitatea tinctorială (gram-pozitivi, gram-negativi, acido-alcoolorezistenți și neacido-alcoolorezistenți).

Pregătirea unui preparat colorat comportă 2 etape: efectuarea frotiului și apoi colorarea.

a. <u>Efectuarea frotiului</u>

Frotiurile se pot practica din produsul patologic ca atare (puroi, spută, exsudat faringian etc.) sau după centrifugarea acestuia, din sediment (l.c.r., urină, lichid pleural etc.); efectuarea frotiului comportă trei timpi:

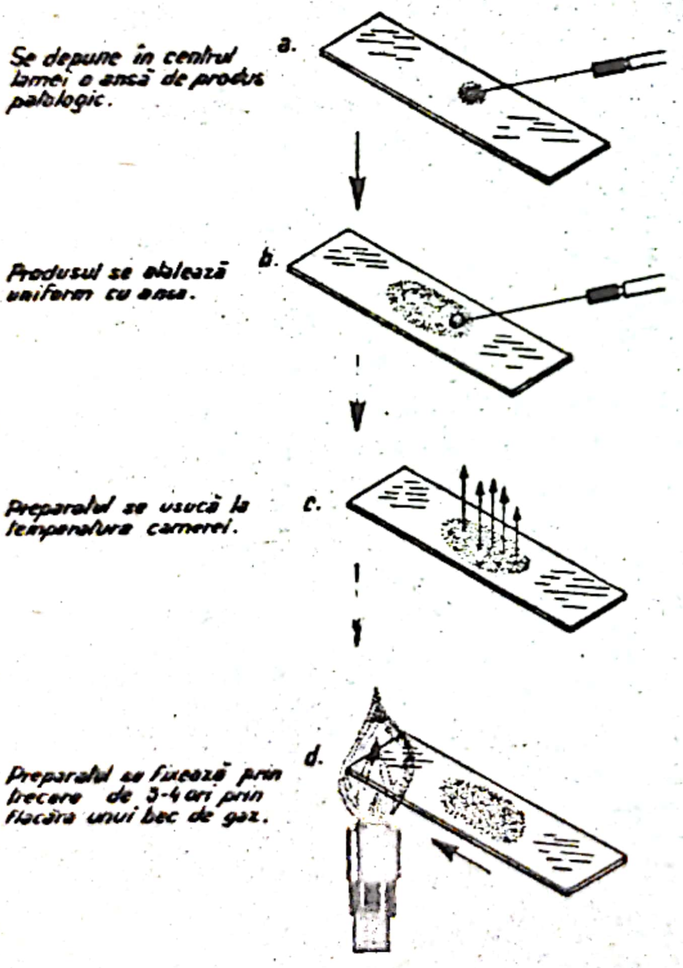


Fig. 16 Tehnica efectuării unui frotiu dintr-un puroi.

i. <u>Etalarea</u>. Produsul de examinat se depune pe o lamă curată și degresată, cu ajutorul unei anse sterile, și apoi se etalează uniform în centrul acesteia, pe o suprafață de aproximativ 2 cm^2 (fig.16, a, b). In caz de fragmente de organe, se efectuează amprente prin atingerea lamei cu suprafața de secțiune a acestora.

ii. <u>Uscarea</u> frotiului se efectuează la temperatura camerei sau la termostat (fig.16, c).

iii. <u>Fixarea</u> se practică prin căldură: lama cu frotiul în sus se trece de cîteva ori, timp de 5-10 secunde, prin flacăra unui bec de gaz sau lampă cu alcool (fig.16, d). Tempera-

tura nu trebuie să fie prea ridicată pentru a nu altera structura bacteriană. Se controlează încălzirea, atingînd lama de partea dorsală a mîinii; ea nu trebuie să frigă.

Prin fixare, preparatul aderă mai bine de lamă iar microorganismele sînt omorîte. Astfel se înlătură posibilitatea de contaminare şi,în acelaşi timp, creşte afinitatea celulei bacteriene faţă de coloranţi.

b. Colorarea

Pentru colorarea frotiurilor se utilizează, în mod obişnuit, coloranţi bazici derivaţi de pararozanilină (ex.violet de metil, cristal violet, fucsină bazică) sau tionină (albastru de metilen) care prezintă afinitate pentru structurile acide ale celulei bacteriene.

Frotiurile se colorează,după caz, prin: coloraţii simple, diferenţiale sau speciale.

1. Coloraţia simplă utilizează un singur colorant, de obicei albastru de metilen. Ea permite stabilirea caracterelor morfologice şi de aşezare ale bacteriilor (fig.17) şi furnizează date în legătură cu elementele celulare din produsul patologic.

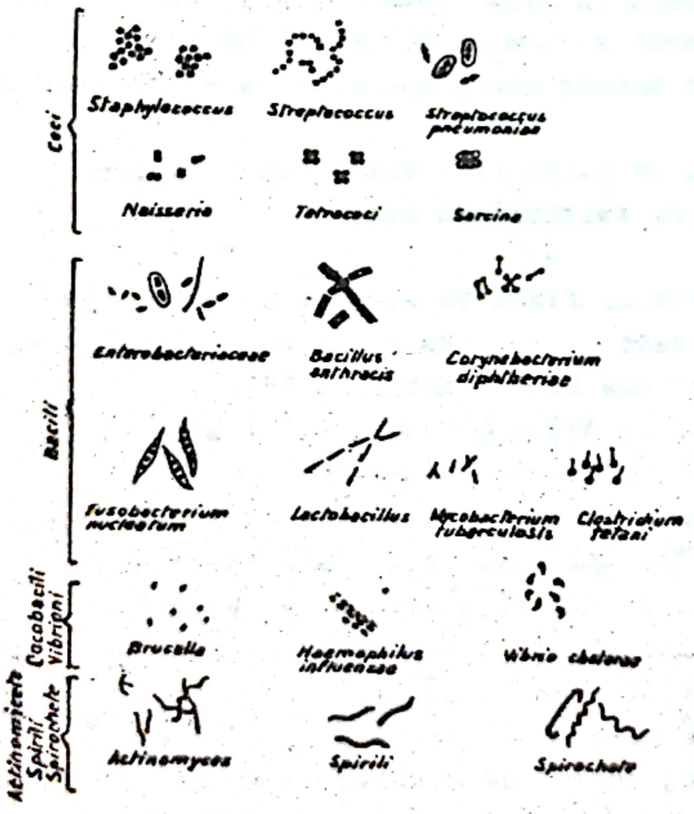


Fig. 17 Aspecte morfologice ale bacteriilor.

In coloraţia simplă, atît bacteriile cît şi restul elementelor din proba examinată capătă culoarea colorantului utilizat. Pentru unele structuri celulare (capsulă, granulaţii metacromatice), albastru de metilen produce metacromazie, acestea apărînd colorate în roşu sau roz.

Tehnica coloraţiei: frotiul fixat se acoperă cu soluţia colorantă, care se lasă să ac-

Scanned with OKEN Scanner

ţioneze 30-60 secunde. Se varsă colorantul, se spală cu apă de robinet şi apoi lama se usucă la aer, aşezată vertical pe un suport de lame.

ii. Coloraţiile diferenţiale au cea mai largă utilizare în bacteriologie deoarece permit atît caracterizarea morfologică şi de aşezare a bacteriilor cît şi gruparea acestora după afinitatea tinctorială. Astfel, prin coloraţia Gram, bacteriile se diferenţiază în gram-pozitive şi gram-negative, iar prin coloraţia Ziehl-Neelsen în bacterii acido-alcoolorezistente şi neacido-alcoolorezistente.

• Coloraţia Gram. S-a observat că unele bacterii colorate cu violet de metil şi mordanţate cu iod rezistă la decolorarea cu alcool-acetonă, iar altele se decolorează sub acţiunea alcool-acetonei şi necesită pentru evidenţiere la microscop utilizarea unui alt colorant: fucsina bazică Ziehl. Bacteriile care reţin colorantul după decolorare sînt denumite gram-pozitive şi apar colorate în violet, iar cele care se recolorează cu fucsină Ziehl sînt denumite gram-negative şi apar colorate în roşu. Această comportare diferenţiată a bacteriilor în coloraţia Gram se datoreşte structurii diferite a peretelui celular la bacteriile gram-pozitive şi gram-negative.

In frotiurile din produs patologic, elementele celulare (leucocite, celule tisulare) apar colorate în roz.

Tehnica coloraţiei

C o l o r a r e a: frotiul fixat se acoperă cu o soluţie apoasă 0,2% de violet de metil care se menţine timp de 1 minut; se varsă colorantul şi se spală cu apă de robinet (fig.18).

M o r d a n ţ a r e a: se acoperă frotiul cu o soluţie Lugol[x], se menţine 1 minut, apoi se varsă.

D e c o l o r a r e a: diferenţierea se practică cu alcool-acetonă 1/10, 5-15 secunde în raport cu grosimea preparatului; se dau mişcări de înclinare lamei pînă cînd colorantul nu mai trece vizibil în soluţia decolorantă, frotiul devenind alburiu; în acest moment se spală rapid lama cu apă de robinet.

R e c o l o r a r e a: se acoperă frotiul cu fucsină Ziehl diluată 1/10 timp de 1 minut, după care frotiul se spală şi se usucă.

---

[x] Soluţie iodo-iodurată.

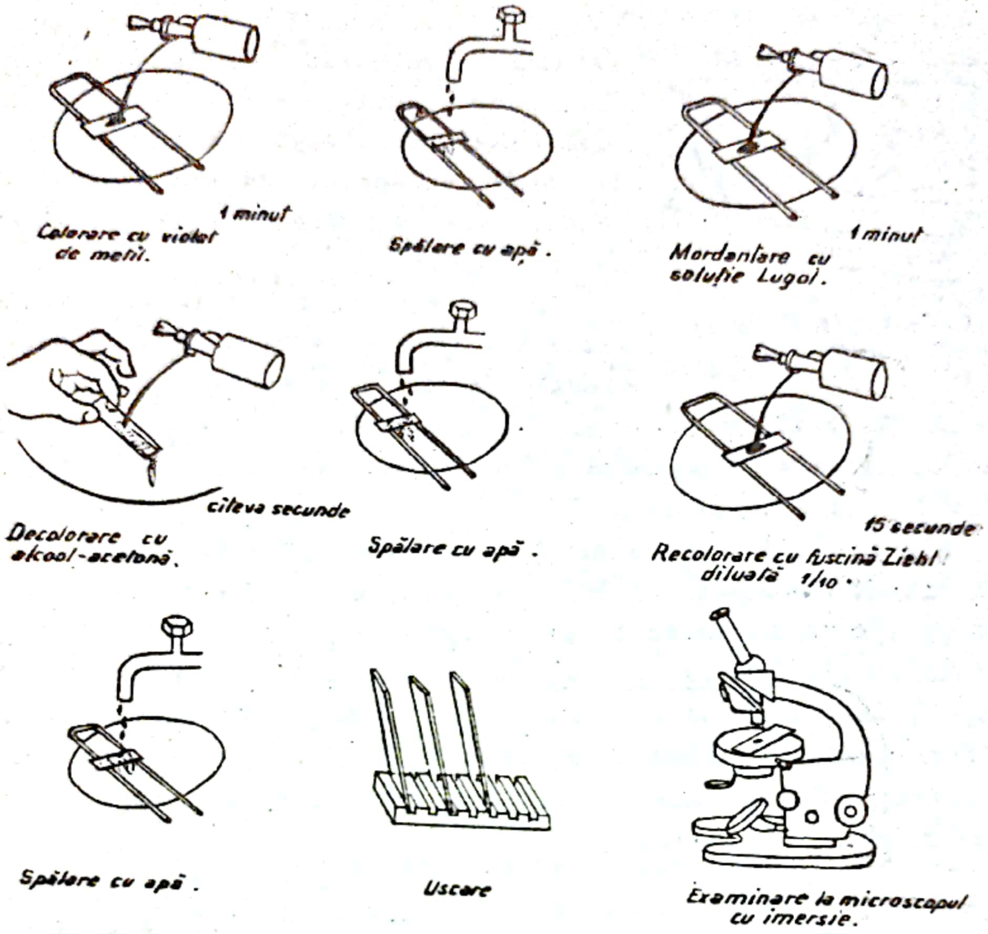


Fig. 18 Etapele coloraţiei Gram.

• <u>Coloraţia Ziehl-Neelsen</u> este folosită numai pentru bacteriile din genul <u>Mycobacterium,</u> care se colorează greu prin celelalte metode datorită unor substanţe ceroase prezente în structura peretelui celular. Din acelaşi motiv colorarea mycobacteriilor se face la cald, acestea rezistînd la decolorarea cu acizi minerali diluaţi şi alcool. Bacteriile acido-alcoolorezistente apar colorate în roşu în timp ce elementele celulare din produs şi toţi ceilalţi microbi neacido-alcoolorezistenţi se colorează în albastru.

<u>Tehnica coloraţiei</u>

C o l o r a r e a: se aşează lama pe un suport metalic şi se acoperă frotiul cu 2-3 ml dintr-o soluţie de fucsină fenicată Ziehl. Se încălzeşte lama de 3-4 ori, în interval de 8-10 minute, trecînd

Scanned with OKEN Scanner

flacăra unei lămpi de spirt pe sub lamă pînă la emitere de vapori (fig.19). Preparatul trebuie să fie în permanenţă acoperit cu soluţia colorantă; dacă prin evaporare cantitatea de colorant scade, se adaugă o nouă cantitate. Se varsă colorantul, se spală abundent lama cu apă de robinet şi se aşează din nou pe suport.

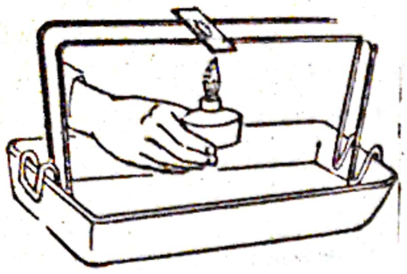


Fig. 19 Coloraţia Ziehl. Etapa de colorare la cald.

D e c o l o r a r e a: se efectuează acoperind lama cu o soluţie de alcool-clorhidric 3% x), timp de 2-3 minute. Se varsă decolorantul şi se spală cu apă. O decolorare bună este indicată de culoarea alb-rozie a frotiului. Dacă frotiul a rămas încă roşu se repetă decolorarea.

R e c o l o r a r e a: se realizează prin acoperirea frotiului cu albastru de metilen 1%, timp de 1 minut. Se spală bine lama la jet de apă şi se usucă la aer, vertical.

iii. Coloraţiile speciale sînt folosite pentru punerea în evidenţă a unor structuri morfologice ale celulei microbiene (flageli, granulaţii metacromatice, capsulă şi spori); de menţionat că prin coloraţia Gram, capsula şi sporii pot fi vizualizaţi sub formă de zone clare (necolorate).

Examinarea frotiurilor colorate se face la microscopul optic cu imersie (90x - 100x), condensatorul fiind ridicat şi diafragmul deschis la maximum (fig.2o). Se depune o picătură de ulei de cedru pe frotiul uscat; picătura se va lăsa să cadă singură pe lamă, fără a atinge frotiul cu aplicatorul de ulei. Se aşează lama de examinat pe platina microscopului. Apoi se coboară tubul cu ajutorul vi-

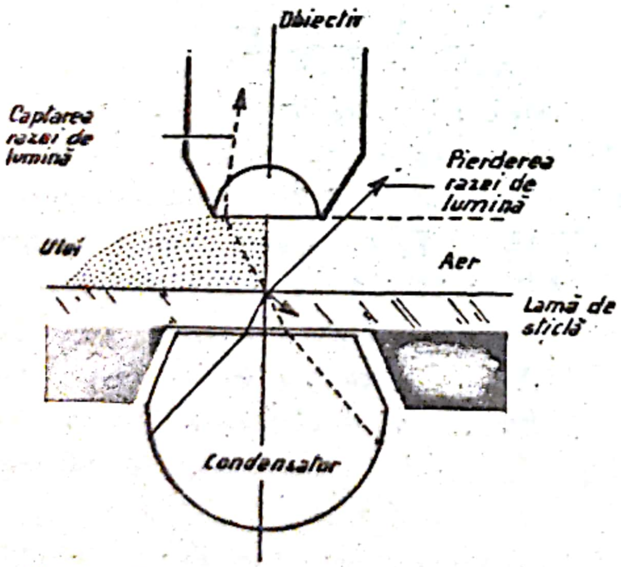


Fig. 20 Reprezentare schematică a comportării razei de lumină în condiţiile utilizării obiectivului cu imersie.

x) 3 ml HCl + 97 ml alcool etilic de 70°.

zei macrometrice, privind lateral, pînă ce lentila frontală a obiectivului ajunge în contact cu picătura de ulei de cedru. Din acest moment, privind prin ocular, vom ridica cu grijă tubul, punînd la punct imaginea, mai întîi cu viza macrometrică şi apoi cu viza micrometrică.

După terminarea examenului, întîi se ridică tubul microscopic cu viza macrometrică şi apoi se scoate lama de pe platină pentru a evita zgîrierea lentilei frontale a obiectivului. Uleiul de cedru rămas pe imersie se şterge imediat cu pulpa degetului şi nu cu vată sau tifon uscat sau îmbibat cu xilol. Pentru protejarea dispozitivelor optice se coboară condensatorul, iar revolverul se roteşte pentru ca obiectivele să fie îndepărtate de fanta centrală a platinei microscopului. Microscopul se introduce apoi în cutia de lemn sau se acoperă cu un clopot de sticlă sau husă.

O altă modalitate de evidenţiere a bacteriilor în preparat colorat o constituie <u>examenul microscopic cu fluorescenţă</u>. Această metodă se bazează pe principiul că un corp fluorescent supus acţiunii razelor ultraviolete (RUV) invizibile apare luminos prin transformarea acestora în radiaţii vizibile; ca sursă de RUV se foloseşte o lampă de cuarţ cu vapori de mercur.

Vizualizarea bacteriilor într-un produs patologic la microscopul cu fluorescenţă poate fi realizată în două moduri: fie prin tratarea frotiurilor cu substanţe fluorescente [x)] - fluorocromarea (metodă rapidă de decelare a bacilului Koch în spută), fie mai ales prin utilizarea unor procedee imunofluorescente (folosirea de seruri imune cuplate cu izothiocianat de fluoresceină).

B. <u>IZOLAREA BACTERIILOR</u>

Izolarea bacteriilor se poate face prin însămînţarea produsului pe medii de cultură (metodă „in vitro") şi/sau prin inocularea acestuia la animale de laborator sensibile (metodă „in vivo").

1. <u>Izolarea „in vitro"</u>

Izolarea bacteriilor din produse patologice pe medii de cultură reprezintă o etapă principală a diagnosticului bacteriologic, deoarece permite:

[x)] Fluorocromii mai frecvent utilizaţi: fluoresceina care dă o fluorescenţă verzuie, auramina - galbenă şi rodamina - portocalie.

- evidenţierea bacteriilor în cazul în care examenul microscopic a fost negativ (numărul microbilor redus în produs) sau neconcludent (specii bacteriene diferite cu caractere morfotinctoriale asemănătoare);

- precizarea diagnosticului bacteriologic în funcţie de aspectul culturii şi condiţiile de cultivare;

- obţinerea microbilor în cultură pură în vederea identificării şi testării sensibilităţii lor la antibiotice.

Izolarea microbilor din produse patologice se realizează punînd în contact o mică cantitate din produs cu anumite substanţe nutritive capabile să favorizeze dezvoltarea şi multiplicarea bacteriilor în condiţii artificiale. Această operaţie se numeşte cultivarea microbilor iar complexul de substanţe folosit în acest scop poartă numele de mediu de cultură.

Ca regulă generală, izolarea bacteriilor pe medii de cultură se va practica înaintea începerii terapiei antimicrobiene.

a. Medii de cultură

i. Caracteristicile esenţiale şi obligatorii ale unui mediu de cultură:

- să fie nutritiv, adică să conţină substanţele plastice şi energetice necesare microorganismului cercetat;

- să aibă un pH optim, situat pentru majoritatea bacteriilor în jurul neutralităţii: 6,8-7,4;

- să asigure exigenţele în oxigen, în raport cu tipul lor de respiraţie;

- să fie steril.

ii. Clasificarea mediilor de cultură

După substanţele nutritive folosite pentru preparare, mediile de cultură se clasifică în:

• medii simple: bulion, geloză ce conţin substanţele nutritive de bază: extract apos de carne, cord, creier sau ficat la care se adaugă peptonă 1% şi clorură de sodiu 0,5%. Geloza se obţine prin gelificarea bulionului cu agar x). Mediile simple asigură cultivarea majorităţii speciilor bacteriene;

---

x) Fitocoloid de natură polizaharidică, extras din anumite alge marine, care are proprietatea de a se îmbiba la cald cu o mare cantitate de apă (de 50 ori greutatea sa) şi de a se solidifica prin răcire.

• <u>medii compuse</u>: geloză-sînge, bulion-ser, bulion-glucozat etc., care se obţin prin adăugarea la mediile simple a unor lichide organice (sînge, ser, lichid de ascită etc.), extract de levură sau zaharuri (glucoză). Ele sînt folosite pentru microorganisme mai pretenţioase nutritiv, care nu cultivă pe medii simple;

• <u>medii speciale</u> care conţin o serie de ingrediente necesare pentru izolarea şi identificarea anumitor specii bacteriene. In raport cu scopul utilizării lor, aceste medii se pot subdiviza în:

- <u>medii selective</u>, ce au în compoziţia lor substanţe care inhibă dezvoltarea altor bacterii decît a aceleia pe care dorim să o izolăm dintr-un produs. De ex. mediul HYL cu antibiotice: lincomicină şi colimicină pentru izolarea gonococului; mediul Sabouraud cu cloramfenicol pentru izolarea levurei <u>Candida albicans</u>;

- <u>medii de diferenţiere</u>, care evidenţiază unele proprietăţi metabolice ale bacteriilor. Aceste medii conţin un anumit substrat, asupra căruia acţionează specific o enzimă bacteriană,şi un indicator de pH care evidenţiază acţiunea enzimei asupra substratului. De ex. mediul AABTL (agar-albastru de bromthimol-lactoză) permite diferenţierea enterobacteriilor în lactozo-pozitive şi lactozo-negative; geloza-sînge diferenţiază bacteriile după prezenţa sau absenţa şi tipul hemolizei bacteriene. Majoritatea mediilor selective sînt în acelaşi timp şi diferenţiale (ex. mediile Wilson-Blair, Leiffson şi SS folosite pentru izolarea şi diferenţierea enterobacteriilor);

- <u>medii de îmbogăţire</u>, medii lichide care permit înmulţirea anumitor bacterii patogene dintr-un produs în detrimentul altor specii microbiene de asociaţie. De ex. bulionul cu selenit acid de sodiu favorizează izolarea salmonellelor din probe de materii fecale prin inhibarea florei coliforme; mediul OST (ou-ser-telurit de potasiu) favorizează izolarea bacilului difteric din probe de exsudat faringian;

- <u>medii de identificare</u>, ce conţin unul sau mai multe ingrediente care sînt atacate specific de anumite enzime microbiene; aceste medii sînt utilizate pentru identificarea bacteriilor. De ex. mediul TSI (agar cu trei zaharuri şi sulfat feros) şi mediul MIU (mobilitate-indol-uree), folosite în caracterizarea biochimică a enterobacteriilor;

Scanned with OKEN Scanner

- <u>medii anaerobe</u>, care sînt utilizate pentru izolarea bacteriilor anaerobe. Aceste medii conţin o serie de ingrediente cu acţiune oxido-reducătoare (acid thioglicolic, clorhidrat de cisteină, carne uscată etc.), de ex. bulionul VF cu acid thioglicolic; de asemenea la mediile lichide se poate adăuga agar în concentraţie mică, 5 ‰, care, asigurînd mediului o consistenţă semi-solidă, se opune pătrunderii aerului.

După c o n s i s t e n ţ ă mediile de cultură se clasifică în:

• <u>medii lichide</u> (ex. bulion nutritiv), utilizate pentru izolarea bacteriilor din produse monomicrobiene (ex. sînge, l.c.r.), studiul unor proprietăţi biochimice, obţinerea toxinelor microbiene etc. Mediile lichide, repartizate în eprubete, baloane, trebuie să aibă aspect clar pentru a surprinde opacifierea legată de dezvoltarea culturii;

• <u>medii solide</u> (ex. geloză cu agar 20-25‰), folosite în special pentru izolarea bacteriilor din produse patologice multimicrobiene (ex. materii fecale, exsudat faringian), evidenţierea unor proprietăţi biochimice etc. Mediile solide se repartizează în plăci Petri sau în eprubete unde sînt solidificate în coloană sau pantă;

• <u>medii semisolide</u> (ex. geloză cu agar 5-7‰), folosite pentru conservarea tulpinilor microbiene, determinarea unor caractere biochimice, studiul mobilităţii bacteriilor etc.; sînt repartizate în eprubete şi solidificate în coloană.

b. <u>Metode de însămînţare şi izolare a bacteriilor</u>

In funcţie de natura produsului patologic, indicaţiile examenului microscopic, cît şi a diagnosticului clinic prezumtiv al infecţiei bacteriene se alege metoda de însămînţare şi mediile de cultură adecvate.

Prin î n s ă m î n ţ a r e se înţelege trecerea unei cantităţi dintr-un produs patologic sau cultură, <u>inoculum</u>, pe medii de cultivare în scopul izolării bacteriilor în cultură pură. Manopera de însămînţare se va efectua respectînd riguros metoda lucrului aseptic (vezi cap.II).

1. <u>Insămînţarea pe medii solide</u>

• <u>Insămînţarea în striuri pe suprafaţa mediului repartizat în plăci Petri</u>, este metoda curentă de izolare a bacteriilor dintr-

un produs multimicrobian. Placa Petri, cu suprafaţa mediului bine uscată, prezentă pe masa de lucru, se întredeschide cu ajutorul mîinii stîngi (fig. 21). Ansa încărcată cu produs sau tamponul de vată cu exsudat se descarcă pe o arie a suprafeţei mediului (fig.22, a). Se sterilizează ansa şi se verifică temperatura sa prin atingerea mediului; se retrece ansa pe suprafaţa zonei anterior însămînţată şi apoi se realizează dispersia produsului prin efectuarea de striuri paralele pe un alt sector al plăcii (fig.22, b). Se procedează asemănător în celelalte sectoare ale plăcii (fig.22, c, d, e). După menţinere la termostat se observă în zona „a" colonii [x] numeroase care confluează, în timp ce pe următoarele arii (b,c,d,e), coloniile sînt din ce în ce mai rare şi în final izolate (fig.22). Se aleg coloniile cu aspectul cultural care interesează şi se reînsămînţează (se repică) pe alte medii pentru obţinerea culturii pure.

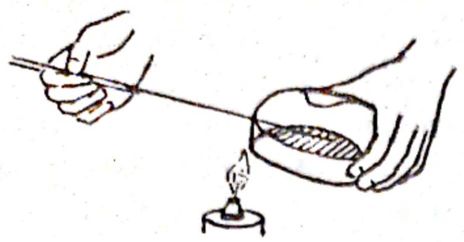


Fig.21 Însămînţarea cu ansa pe mediu solid repartizat în cutie Petri.

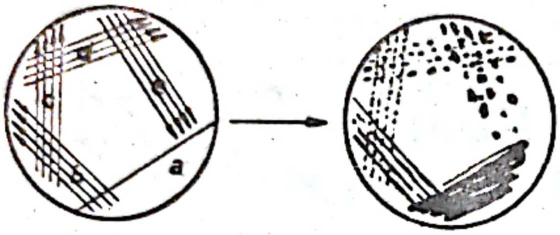


Fig. 22 Schematizare a modului de dispersie, a produsului patologic, cu ansa pe suprafaţa mediului repartizat în cutie Petri, pentru obţinerea de colonii izolate.

Metoda de însămînţare în striuri permite aprecierea semicantitativă a dezvoltării bacteriilor din inoculum. Astfel, prezenţa a ≥5 colonii în sectorul e de dispersie se va nota cu +++, în sectorul d cu ++ iar în sectoarele c şi b cu +.

• Însămînţarea în striuri pe suprafaţa mediului repartizat în pantă. Ansa cu produsul microbian se introduce pînă aproape de extremitatea inferioară a eprubetei şi apoi se retrage uşor descriind pe suprafaţa mediului striuri în zigzag, fără a-l zgîria (fig.23). Inoculum este epuizat prin însămînţare pe mai multe tuburi, obţinîndu-se în final colonii izolate.

• Însămînţarea în profunzimea mediului solid repartizat în,

x) Colonia reprezintă o acumulare locală de bacterii descendente dintr-o singură celulă parentală.

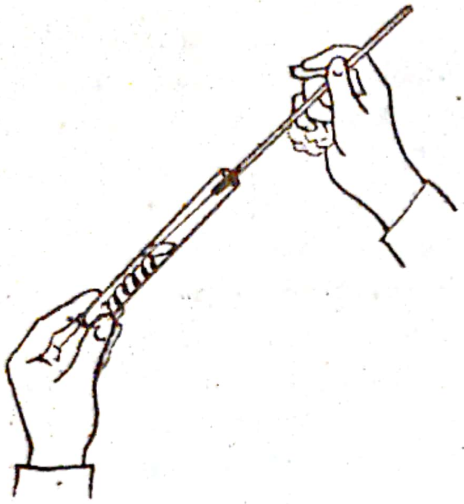


Fig.23 Însămînțare cu ansa pe mediu solid repartizat în pantă.

coleană dreaptă, se realizează cu firul de platină drept, descărcînd inoculum în mijlocul cilindrului realizat de mediu. Această metodă de însămînțare se practică pentru determinarea mobilității bacteriilor, studiul unor caractere biochimice, conservarea tulpinilor microbiene etc.

ii. Insămînțarea în medii lichide.

Insămînțarea produsului microbian în medii lichide în vederea izolării bacteriilor se practică numai pentru produsele monomicrobiene. Inoculum este depus cu pipeta Pasteur iar în cazul hemoculturii însămînțarea sîngelui se face direct din seringa de recoltare.

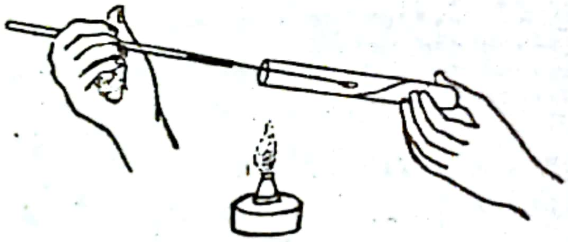


Fig.24 Însămînțare cu ansa în mediu lichid.

Repicarea unei colonii microbiene pe mediul lichid se poate realiza cu ansa care se descarcă prin frecare pe peretele eprubetei (fig.24), la partea superioară a lichidului.

iii. Metode speciale de însămînțare

• Insămînțarea și izolarea bacteriilor anaerobe se face la adăpost de contactul cu oxigenul atmosferic. Pentru aceasta, înainte de însămînțare, recipientele cu mediu lichid se „regenerează" prin fierbere la baie de apă, timp de 15-30 minute și apoi se răcesc brusc la jet de apă. Insămînțarea se face cu ansa sau pipeta în profunzimea mediului, fără barbotare. După însămînțare, la suprafața mediului se depune un strat de 1-2 ml ulei de vaselină sau parafină steril, pentru menținerea condițiilor de anaerobioză create.

Anaerobioza mai poate fi realizată prin procedee chimice, adică introducerea în mediul de cultură a unei substanțe chimice

reducătoare ca acidul thioglicolic (ex. mediul VF).

Insămînțarea pe medii solide, repartizate în cutii Petri, se efectuează epuizînd inoculum ca și în cazul bacteriilor aerobe; cultivarea la adăpost de oxigenul atmosferic se poate realiza prin 2 procedee (vezi pag.48). Izolarea bacteriilor anaerobe se mai poate efectua pe agar repartizat în tuburi înalte și înguste (tuburi Weinberg) care asigură un contact redus cu aerul.

• Izolarea bacteriilor sporulate dintr-un produs cu floră mixtă se bazează pe proprietatea de termorezistență a sporilor. Produsul ca atare sau suspensionat în soluție salină izotonă este încălzit la baie de apă la 80°C, timp de 10 minute, pentru distrugerea formelor vegetative și apoi însămînțat după una din tehnicile descrise mai sus, în condiții de aerobioză sau anaerobioză.

c. Incubarea

Recipientele cu mediul însămînțat se introduc în termostat[x)] pentru incubare la 37°C, temperatura optimă de dezvoltare pentru marea majoritate a microbilor patogeni.

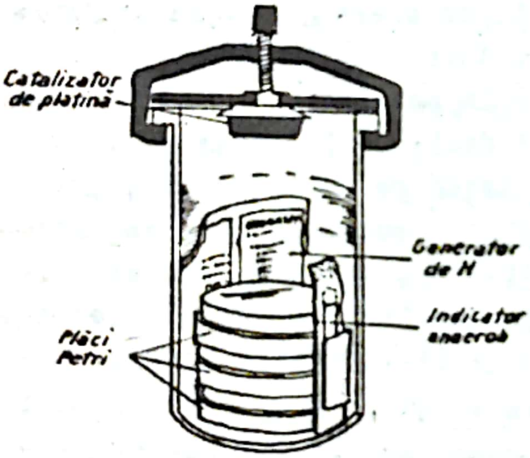


Fig.25 Anaerostat

Pentru cultivarea bacteriilor anaerobe este necesar ca mediile însămînțate să fie introduse în recipiente speciale, ex. anaerostate și apoi incubate la termostat (fig.25). In anaerostate oxigenul este îndepărtat prin combinare cu hidrogenul (eliberat de un generator de H) formînd H_2O în prezența unui catalizator de platină. Pentru securitatea condițiilor de anaerobioză se folosește un indicator, albastru de metilen.

In absența anaerostatului se poate utiliza metoda cu pirogalol alcalin. Pe fața exterioară a capacului cutiei Petri se fixează

---

x) Termostatul (etuvă sau incubator) este reprezentat de un aparat (cameră-termostat), cu pereții dubli, din metal sau lemn, izolați termic. Termostatul este dotat cu un termoregulator, termometru de control a temperaturii; încălzirea se face electric.

cu bandă adezivă un pachețel din hîrtie de filtru ce conține substanțe reducătoare (pirogalol 0,4 g, CO_3K_2 0,4 g și talc 8 g (fig.26,a). Se ia cealaltă parte a cutiei Petri, cu mediul însămînțat și se răstoarnă deasupra capacului; se fixează zona de contact a celor două părți a cutiei Petri, cu parafină solidă topită creîndu-se astfel în interior un spațiu închis ermetic (fig.26,b).

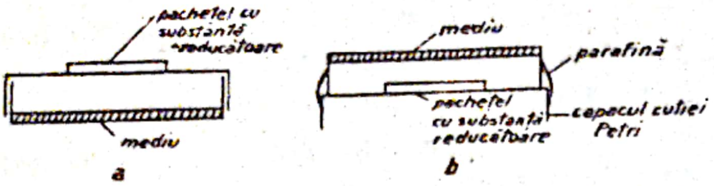


Fig.26 Metodă de realizare a anaerobiozei în cazul însămînțării pe medii solide repartizate în cutii Petri.

Unele bacterii necesită la izolarea din organism o atmosferă de CO_2 5-10% (ex. Neisseria gonorrhoeae, Actinomyces israelii) care poate fi realizată într-un recipient închis etanș și prevăzut cu un generator de CO_2. In lipsa acestui sistem se introduce în recipient o lumînare aprinsă, care se stinge în momentul realizării unei concentrații de 5-10% CO_2 (fig.27).

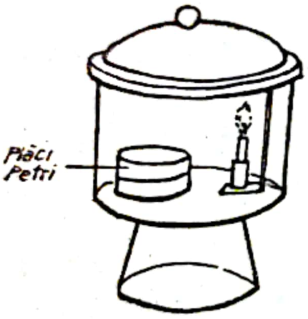


Fig. 27 Sistem simplu pentru realizarea atmosferei de CO_2.

După o incubare de 18-24 ore, pe mediile însămînțate se poate observa macroscopic apariția culturii microbiene. Unele specii necesită o incubare de cîteva zile (ex. actinomicetele) sau chiar săptămîni (ex. bacilul Koch).

2. Izolarea „in vivo"

Inocularea la animale de laborator (șoareci, cobai, iepuri) reprezintă, în unele cazuri, o metodă rapidă de izolare a microbilor din produse patologice iar uneori chiar singura posibilitate de izolare. Ea se bazează pe sensibilitatea deosebită a unor specii animale la anumite bacterii; astfel pentru izolarea bacilului Koch din produse paucibacilare se folosește cobaiul, pentru izolarea Str.pneumoniae, Kl.pneumoniae șoarecele etc.

Metoda este utilizată în practică și pentru studiul proprietăților de patogenitate ale bacteriilor în scopul identificării lor (vezi cap.V).

Pentru inoculare este necesar să fie cunoscute: modalitățile

Scanned with OKEN Scanner

de contenţie şi imobilizare a animalelor, tehnica şi calea de inoculare cea mai eficientă în raport cu natura produsului şi specia bacteriană pe care vrem să o izolăm.

Contenţia animalelor se face manual sau cu aparate speciale. Şoarecele se prinde de vîrful cozii, se aşează pe masa de lucru şi cu cealaltă mînă se apucă de pielea cefii. Cobaiul se imobilizează cuprinzînd cu o mînă toracele şi membrele anterioare şi cu cealaltă centura pelvină.

Inocularea produsului se face cu seringă şi ac steril după depilare şi antiseptizare locală a tegumentului animalului cu alcool-iodat.

Din multitudinea metodelor de inoculare, pentru izolarea bacteriilor se folosesc mai ales inocularea pe cale subcutanată şi cea intraperitoneală.

Inocularea subcutanată se practică în special pentru produsele contaminate: flora de asociaţie rămîne la locul de inoculare iar microbul patogen difuzează în organism. Pentru cobai, locul de elecţie este faţa internă a coapsei iar pentru şoarece, pielea spatelui la baza cozii.

Inocularea intraperitoneală se recomandă în cazul produselor monobacteriene şi se efectuează în regiunea subombilicală, paramedian: se introduce acul mai întîi orizontal, subcutanat, aproximativ 1 cm şi apoi se dă acestuia o înclinare verticală, ceea ce permite perforarea peretelui muscular şi pătrunderea în peritoneu.

Animalele inoculate sînt marcate prin vopsire şi introduse în cuşti sau borcane etichetate. Ele vor fi supravegheate urmărindu-se: starea generală, temperatura, greutatea, leziunea la locul inoculării, simptomele nervoase etc. Animalele moarte sau sacrificate vor fi imediat necropsiate x).

Izolarea bacteriei de la animalul inoculat se realizează fie din sînge, practicîndu-se o hemocultură din cord, fie din organe, efectuîndu-se însămînţări şi/sau reinoculări la alte animale. De asemeni se fac amprente din organe şi frotiuri din sînge care se vor colora, după caz, Gram sau Ziehl-Neelsen.

Pentru examen histologic, se prelevă fragmente de organe care vor fi introduse în borcane cu soluţie fixatoare (formol 10%).

---

x) Animalele necropsiate vor fi incinerate. Instrumentarul, tăvile de autopsie, căldările de transport a cadavrelor se dezinfectează şi apoi se sterilizează prin autoclavare.

V. METODE DE IDENTIFICARE A BACTERIILOR

După izolarea microorganismelor în cultură pură, următoarea etapă a diagnosticului bacteriologic este identificarea care permite, pe baza unui complex de caractere: morfotinctoriale, de cultură, biochimice, de patogenitate şi serologice, stabilirea identităţii taxonomice şi a implicării etiologice a bacteriei izolate.

In anumite conjuncturi epidemiologice, identificarea tulpinii izolate va fi completată cu precizarea tipului bacteriofagic-lizotiparea.

Cu mici excepţii, tulpinile microbiene cu implicaţie etiologică vor fi testate din punct de vedere a sensibilităţii la antibiotice cu ajutorul antibiogramei (vezi cap.VII).

Pentru fiecare infecţie, identificarea microbiană prezintă particularităţi care vor fi redate în capitolele de bacteriologie specială.

A. CERCETAREA CARACTERELOR MORFOTINCTORIALE SI DE MOBILITATE (vezi cap.IV)

B. CERCETAREA CARACTERELOR DE CULTURA

Pentru caracterizarea unei culturi bacteriene se va ţine seama de condiţiile de cultivare, aspectul macroscopic şi microscopic al culturii.

a. Condiţiile de cultivare se referă la necesităţile nutritive ale bacteriei (medii simple, compuse sau speciale), condiţiile de incubare (aerobe, anaerobe sau în prezenţa CO_2), temperatura optimă de dezvoltare, precum şi timpul de apariţie al culturii.

b. Aspectul macroscopic include studiul caracterelor de cultură pe medii solide sau lichide.

1. Pe medii solide, bacteriile cultivă sub formă de colonii a căror aspect furnizează adesea indicaţii preţioase pentru identificarea unei specii bacteriene.

Scanned with OKEN Scanner

Coloniile diferă ca dimensiune (colonii mari: 2-3 mm Ø, mici: 0,1-1 mm Ø şi mijlocii: 1-2 mm Ø), contur (regulat, crenelat), suprafaţă (lucioasă, mată, umedă sau uscată), relief (plat, bombat, mamelonat etc.), culoare (nepigmentate sau pigmentate), opacitate (opace, transparente sau translucide), consistenţă (mucoasă, cremoasă) etc. (fig.28). In raport cu atributele enumerate, se deosebesc 2 tipuri principale de colonii:

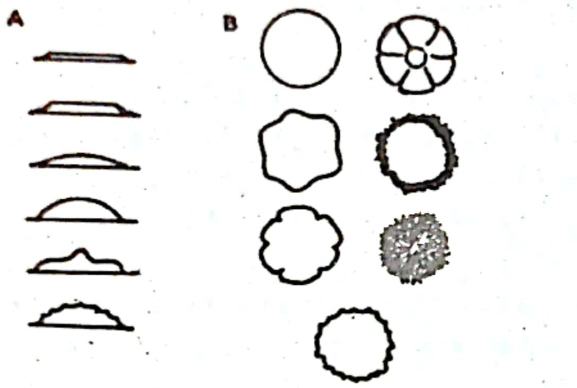


Fig.28 REPREZENTARE SCHEMATICA A RELIEFULUI (A) SI CONTURULUI (B) COLONIILOR BACTERIENE

- colonii S (smooth= neted), cu relief bombat, contur circular, regulat sau lobat, suprafaţa netedă, lucioasă şi umedă; prin emulsionare în soluţie salină izotonă dau o suspensie omogenă;

- colonii R (rough= rugos), plate, cu suprafaţa aspră, uscată, mată şi contur neregulat, crenelat sau filamentos; ele nu se emulsionează în soluţie salină izotonă dînd suspensii granulare.

Marea majoritate a bacteriilor patogene cultivă la izolarea din organismul infectat sub formă de colonii S; în subculturi repetate sau în culturi vechi, acestea se transformă în colonii R, degradate antigenic şi avirulente. Fac excepţie unele specii bacteriene, de ex. Mycobacterium tuberculosis şi Bacillus anthracis, care, în momentul izolării de la bolnav, se dezvoltă sub formă de colonii R.

ii. Pe medii lichide, aspectul culturii poate fi definit printr-o serie de caractere: turbiditate, sediment, peliculă la suprafaţă, miros, culoare. De ex. stafilococii tulbură uniform mediul, în timp ce bacilul Koch lasă mediu clar cu formare de văl la suprafaţă. In general, aspectul culturii pe medii lichide este asemănător pentru un mare număr de specii microbiene, de aceea furnizează puţine date pentru identificarea bacteriilor.

c. Aspectul microscopic. Pentru identificarea unei bacterii implicată într-o infecţie, datele morfotinctoriale obţinute la

examenul microscopic al produsului patologic vor fi coroborate cu rezultatele examenului microscopic practicat din cultură.

Pentru efectuarea frotiului dintr-o cultură microbiană în mediu lichid se ia cu ansa sau cu pipeta Pasteur o picătură care se depune în centrul unei lame şi se etalează. Dacă este o cultură pe mediu solid se suspendă cu ansa o porţiune dintr-o colonie într-o picătură de soluţie salină izotonă, pipetată în prealabil pe lamă, după care preparatul se întinde uniform. După fixare prin căldură, frotiul se colorează şi se examinează conform tehnicii descrise la cap.IV.

C. CERCETAREA CARACTERELOR BIOCHIMICE

Stabilirea pattern-ului biochimic reprezintă, pentru unele bacterii, un important criteriu de identificare, permiţînd definirea lor ca gen, specie, biotip (ex. bacteriile din familia *Enterobacteriaceae*, genul *Neisseria* etc.).

Metodele utilizate pentru studiul proprietăţilor biochimice se bazează pe cunoaşterea sistemelor enzimatice proprii fiecărei unităţi taxonomice bacteriene.

In practică, activitatea enzimatică se cercetează „in vitro" pe medii de cultură la care s-a încorporat substratul de metabolizat corespunzător. In continuare sînt redate cîteva exemple de cercetare a activităţii enzimatice bacteriene.

a. *Testul de oxidare-fermentare* (OF) permite diferenţierea între bacteriile care metabolizează glucoza oxidativ (genul *Pseudomonas*) sau fermentativ (familia *Enterobacteriaceae*). Bacteria de identificat este însămînţată în 2 tuburi cu geloză glucozată 1% şi un indicator de pH. Incubarea se face aerob şi anaerob. Dacă degradarea glucozei se face oxidativ, indicatorul virează numai în tubul incubat aerob iar dacă se face fermentativ, virarea apare în ambele tuburi.

b. *Fermentarea hidraţilor de carbon* este evidenţiată prin însămînţarea tulpinii de identificat pe medii ce conţin substratul glucidic şi un indicator de pH (albastru de bromthimol, roşu neutru etc.). Metabolizarea zahărului de către bacteria însămînţată se traduce prin acidifierea mediului şi virarea culorii indicatorului de pH. Uneori fermentarea hidraţilor de carbon se însoţeşte de producerea de gaz, care se evidenţiază pe medii semisolide prin

apariția bulelor de gaz la fundul eprubetei și chiar deplasarea coloanei de mediu.

c. Activitatea proteolitică se cercetează prin însămînțarea microbului de testat pe medii speciale: ser de bou coagulat sau mediu gelatinat; mediile însămînțate se incubează la 37°C și respectiv la 22°C. O reacție pozitivă se traduce prin lichefierea mediului de cultură într-un interval de 3-10 zile.

d. Producerea de H_2S se pune în evidență prin încorporarea în mediul de cultură a unor săruri de fier sau plumb (sulfat feros, acetat de plumb etc.). Pe traiectul de însămînțare al tulpinii de testat se produce o înnegrire ca urmare a formării sulfurilor de culoare neagră. Formarea H_2S se mai poate evidenția prin folosirea unor benzi din hîrtie de filtru impregnate cu soluție de acetat de plumb care se atașează la dopul eprubetei; reacția pozitivă se traduce prin înnegrirea hîrtiei de filtru.

e. Producerea de indol de către unele bacterii, prin catabolizarea triptofanului din mediul de cultură, se poate decela prin reactivul Ehrlich x). La o cultură în apă peptonată, de 24-48 ore, a tulpinii de testat, se adaugă 1 ml reactiv. In prezența indolului apare la suprafața mediului un inel roșu-rubiniu. Testul se poate efectua și cu benzi din hîrtie de filtru impregnate cu reactiv și atașate la dopul eprubetei cu apă peptonată sau mediul MIU xx). O reacție pozitivă se traduce prin înroșirea benzii în 24 ore.

f. Producerea de urează se evidențiază prin însămînțarea bacteriei de cercetat într-un mediu care conține uree și un indicator de pH (ex. mediile Blake-Christensen, MIU). Ca urmare a hidrolizei ureei, sub acțiunea ureazei produsă de microb, are loc formarea de amoniac și virarea indicatorului.

D. CERCETAREA CARACTERELOR DE PATOGENITATE

Pentru unele bacterii cercetarea patogenității (virulență și/sau toxicitate) reprezintă unul din cele mai importante criterii de identificare și în același timp de implicare etiologică într-o infecție. Punerea în evidență a factorilor de patogenitate

---

x) Reactivul Ehrlich = para-dimetilaminobenzaldehidă 4 g, acid clorhidric concentrat 80 ml, alcool etilic 96% 380 ml.

xx) Mediul MIU = Mobilitate-Indol-Uree

Scanned with OKEN Scanner

la o bacterie se poate realiza prin metode „in vivo" (pe animale de laborator) și/sau „in vitro" (teste biochimice, serologice).

a. Metode „in vivo". Se folosesc animale de laborator sensibile la bacteria cercetată care reacționează prin producerea unei boli experimentale caracteristice. De ex. inocularea unui produs patologic care conține bacili tetanici intramuscular la șoarece determină apariția unei simptomatologii caracteristice: contracturi care încep la membrul inoculat și apoi se generalizează (membrele devin rigide ca niște „bețe de chibrituri"), cauzînd în final moartea animalului.

Inocularea la animal poate servi de asemenea ca test de implicare etiologică într-o infecție a unei bacterii condiționat patogenă. Astfel pneumococul, component al microbiotei tractusului respirator superior la unele persoane, prezent într-o spută, poate fi considerat ca agent etiologic al unei pneumonii dacă, acest produs inoculat subcutanat la șoarece, determină moartea animalului, în 24-48 ore, cu septicemie.

b. Metode „in vitro". Aceste metode sînt mai rapide și mai economice decît cele „in vivo"; ele permit evidențierea unor factori de patogenitate ca: elaborarea de exotoxine (ex. toxina difterică, enterotoxina stafilococică) sau exoenzime (coagulaza, fibrinolizina, hemolizine etc.). De ex. pentru identificarea stafilococilor patogeni se folosește în special testul coagulazei: o ansă din cultura de 24 ore pe geloză a tulpinii de identificat se suspensionează într-un tub cu 0,5 ml plasmă citratată de iepure, diluată 1/4 în soluție salină izotonă. Tubul este incubat la 37°C, urmărindu-se coagularea plasmei în interval de 1-18 ore. Demonstrarea toxinogenității bacilului difteric, a prezenței enterotoxinei stafilococice se face curent prin metode serologice (vezi punctul E).

E. CERCETAREA STRUCTURII ANTIGENICE

Cercetarea structurii antigenice a bacteriilor - identificarea antigenică - se bazează pe specificitatea reacțiilor antigen-anticorp.

Antigen (Ag) = orice substanță care pătrunsă în organismul vertebratelor produce modificări specifice ale sistemului imun, traduse prin formarea de anticorpi cu care reacționează specific

atît „in vivo" cît și „in vitro".

Antigenele posedă pe suprafața lor mai mulți determinanți antigenici (sînt „multivalente"), putîndu-se combina cu mai multe molecule de anticorpi.

Anticorpi (Ac) = factori specifici, umorali (imunoglobuline) și celulari (limfocite T-reactive) care apar în organism ca răspuns la stimularea antigenică și posedă pe suprafața lor sedii de recunoaștere a antigenului, în baza cărora se cuplează specific cu acesta.

In general Ac au 2 sedii de cuplare cu antigenul, deci sînt bivalenți.

Formarea complexelor Ag-Ac se datorește stabilirii de legături multiple între grupările determinante ale antigenului - epitopi și situsurile de combinare ale anticorpului corespunzător - paratopi, legături favorizate de complementaritatea structurală între cele 2 elemente. După cuplarea inițială a Ag cu Ac, se produc schimbări în starea fizică a complexelor formate, acestea putînd fi observate „in vitro" sub formă de precipitate, aglutinate etc. Acest al doilea timp al reacției este condiționat de factori specifici: polivalența antigenului și bivalența anticorpului, existența unui raport optim între cei 2 reactanți[x)] (fig.29) și de factori nespecifici ca: concentrația de electroliți, temperatură, pH etc.

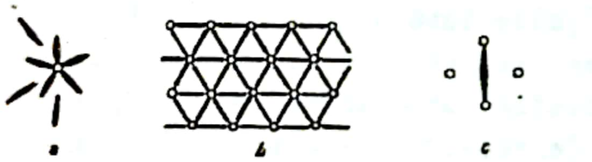


Fig. 29 Importanța raportului optim între Ag și Ac, pentru formarea complexelor vizibile „in vitro". a. exces de anticorpi; b. raport optim (zona de echivalență); c. exces de antigen.

In raport cu natura antigenului (suspensie microbiană, extract microbian, toxină, enzimă etc.) și a tehnicii utilizate există mai multe metode de evidențiere a reacțiilor Ag-Ac (tabelul I).

Datorită specificității lor, reacțiile Ag-Ac au o largă aplicabilitate în diagnosticul bolilor infecțioase, atît pentru iden-

---

x) In zona de echivalență, unde Ag și Ac se găsesc în proporții optime, există condiții favorabile de saturare a unui număr mare de valențe a celor 2 elemente, ceea ce duce la formarea de agregate mari, vizibile, cu aspect de rețea

TABEL I

Antigen	Anticorp	Alte elemente	Reacţia	Evidenţiere
Suspensie microbiană (aglutinogen)	aglutinină	—	Aglutinare	macroscopic (grunji)
Extract microbian (precipitinogen)	precipitină	—	Precipitare	macroscopic (precipitat)
Suspensie microbiană extract microbian	sensibilizină	complement	Reacţia de fixare a complementului	macroscopic (liză)
Toxină microbiană	antitoxină	—	Neutralizare	anularea efectului toxic
Enzimă microbiană	antienzimă	—	Neutralizare	anularea efectului enzimatic
Suspensie microbiană	anticorp marcat x) fluorescent	—	Imunofluorescenţă	microscopic

x) Reacţiile cu anticorpi marcaţi se mai pot realiza utilizînd ca markeri: izotopi radioactivi, feritină, enzime (ex: peroxidaza de hrean), complexul format fiind vizualizat în preparate microscopice examinate la microscopul optic sau electronic.

tificarea bacteriilor (identificare antigenică) cît şi pentru diagnosticul serologic (identificarea anticorpilor).

In acest capitol vor fi prezentate cîteva metode folosite mai frecvent pentru identificarea antigenică (serologică) a bacteriilor. Elementele reacţiei sînt constituite în acest caz de antigen (elementul necunoscut) şi anticorp (elementul cunoscut) reprezentat de seruri imune de referinţă x).

1. Reacţia de aglutinare

Reacţia de aglutinare are loc între celula bacteriană cu determinanţi antigenici pe suprafaţă (suspensie microbiană) şi anticorpul corespunzător. Aglutinarea apare vizibilă sub formă de grunji (agregate de celule bacteriene).

Reacţia de aglutinare se poate practica prin 2 metode: pe lamă (calitativ) şi în tuburi (cantitativ). In ambele cazuri elementele reacţiei vor fi:

- o cultură de 24 ore, pe mediu solid, a bacteriei de identificat;

x) Serurile imune de referinţă sînt preparate la noi în ţară la Institutul Dr.I.Cantacuzino (I.C.) din Bucureşti şi livrate laboratoarelor de diagnostic. Fiolele cu ser imun sînt etichetate cu denumirea serului, titrul anticorpilor şi diluţia la care trebuie folosit în raport cu tehnica reacţiei de practicat.

Scanned with OKEN Scanner

- setul de seruri imune **polivalente** (cuprinde aglutinine comune mai multor specii de bacterii sau mai multor serogrupuri aparținînd aceleiași specii) și **monovalente** (conține anticorpi corespunzători unei singure specii bacteriene sau unui anumit serotip al unei bacterii), diluate la titrul aglutinant pentru reacția pe lamă sau în tub.

a. Reacția de aglutinare pe lamă

Tehnica. Pe o lamă de microscop, curată și degresată, se pune la un capăt o picătură de ser aglutinant polivalent (diluat la titru) iar la extremitatea opusă o picătură de soluție salină izotonă (martor cultură) (fig. 30). In fiecare picătură se suspensionează cu ansa o porțiune dintr-o colonie microbiană și apoi lama se înclină de mai multe ori. Dacă bacteria corespunde serului aglutinant se va observa, în cursul omogenizării amestecului sau după maximum 1-2 minute, apariția aglutinării (grunji vizibili cu ochiul liber sau cu lupa). In picătura martor amestecul rămîne uniform opalescent, aspect care se observă și în cazul unei reacții negative.

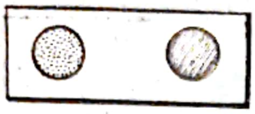


Fig.30 Reacția de aglutinare pe lamă. a. reacție pozitivă. b. reacție negativă (martor).

b. Reacția de aglutinare în tub

Această reacție se practică pentru identificarea bacteriei în cazul în care s-au obținut reacții pozitive pe lamă cu mai multe seruri imune.

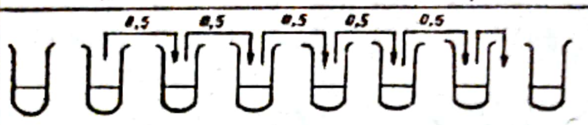
Tehnica. In serii de tuburi (atîtea serii cîte seruri aglutinante verificăm) se fac diluții duble din fiecare ser aglutinant (1/20, 1/40,...), în volum de 0,5 ml diluent (soluție salină izotonă). Diluțiile se practică pînă la titrul maxim al fiecărui ser indicat pe fiolă. Se adaugă în toate tuburile volume egale din suspensia microbiană de identificat etalonată nefelometric. Tubul martor, efectuat pentru a exclude o aglutinare spontană, conține numai suspensia microbiană în soluție salină izotonă (tabelul II).

Tuburile se agită pentru omogenizarea amestecului și apoi se mențin la termostat, la 37°C, 2 ore pentru reacțiile cu Ag flagelare și 20 ore pentru reacțiile cu Ag somatice.

O reacție pozitivă se traduce prin apariția de aglutinate sedimentate la fundul tubului, lichidul supernatant rămînînd

clar x). In tubul martor și eprubetele cu reacție negativă suspensia rămîne omogen opalescentă.

TABEL II REACȚIA DE AGLUTINARE ÎN TUBURI

Tub nr:	I	II	III	IV	V	VI	VII	Martor VIII
Diluent ml:	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser imun de referință 1/10, ml:	 0,5	0,5						
Antigen, ml:	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Diluțiile finale de ser	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	

<u>Serul care aglutinează pînă la diluția cea mai mare, în raport cu titrul său aglutinant, indică specia căreia îi corespunde bacteria de identificat.</u>

Reacția de aglutinare este utilizată de ex. pentru identificarea serologică a bacteriilor din genurile <u>Salmonella</u>, <u>Shigella</u>, <u>Escherichia</u> etc.

2. Reacția de coaglutinare

Reacția de coaglutinare este o reacție serologică în care anticorpul legat prin fragmentul Fc de proteina A a tulpinii Cowan I de <u>S.aureus</u> reacționează prin componenta Fab rămasă liberă cu antigenul omolog corpuscular sau solubil formînd complexe antigen-anticorp; reacția pozitivă se traduce prin apariția unei aglutinări vizibilă macroscopic.

Reacția de coaglutinare se efectuează printr-o tehnică simplă și rapidă, fiind accesibilă tuturor laboratoarelor de bacteriologie care dispun de reactivi coaglutinanți. Dintre aplicațiile sale practice amintim:

- identificarea de specie și de serotip a tulpinilor de <u>Str.pneumoniae</u> și <u>H.influenzae</u>;
- decelarea antigenelor polizaharidice solubile de <u>Str.pneu-</u>

---

x) Gradul de pozitivitate al reacției se notează cu unul sau mai multe plusuri (+), în funcție de mărimea depozitului și claritatea supernatantului.

<u>moniae</u> şi <u>H.influenzae</u> serotip b direct în produse patologice;

- identificarea grupurilor serologice A, B, C şi G de streptococi.[x)].

3. Reacţia de precipitare

Reacţia de precipitare are loc între un antigen solubil (extract microbian, toxină etc.) şi anticorpul precipitant complementar. Ea apare vizibilă sub formă de precipitate sau floculate.

Reacţia de precipitare se poate practica în medii lichide sau gelificate.

a. <u>Precipitarea în mediu lichid</u>

<u>Testul în inel</u>. In tuburi de sticlă cu diametrul mic (3-4 mm), se pipetează 0,1-0,2 ml ser imun. Menţinînd tubul înclinat se adaugă încet o cantitate egală de antigen (extract microbian). In cazul în care există corespondenţă imunologică între anticorpul precipitant şi antigenul testat, la limita de separare a celor 2 reactanţi apare un inel albicios de precipitare (lectura se face după 5 minute pe fond negru).

Reacţia de precipitare în inel (reacţie calitativă) este utilizată pentru determinarea de grup Lancefield a streptococilor, identificarea precipitinogenului în diagnosticul retrospectiv al infecţiei cărbunoase (reacţia Ascoli) etc.

b. <u>Precipitarea în medii gelificate</u>. Are avantajul faţă de precipitarea în mediu lichid că localizează precipitatul în gel (de agar sau agaroză [xx)]) în zona de echivalenţă (adică acolo unde se realizează o neutralizare completă a situsurilor antigenice cu situsurile anticorp); gelul poate fi repartizat în placă sau pe lamă. Există o varietate de tehnici, cea mai frecvent utilizată fiind <u>difuzia dublă radială</u> (în două dimensiuni), metoda în placă Ouchterlony: reactanţii (antigenul şi anticorpul) difuzează unul către altul în grosimea stratului de agar pornind din rezervoare (godeuri) dreptunghiulare sau circulare iar în zona de echivalenţă apar linii (benzi) de precipitare.

[x)] Este în studiu prepararea de reactivi coaglutinanţi pentru identificarea serogrupurilor D, F, H şi K de streptococi şi a serotipurilor în cadrul grupului B.

[xx)] Derivat de agar lipsit de grupările de acid sulfonic

Imunodubla difuzie în gel are numeroase aplicații practice din care redăm pentru exemplificare, identificarea tulpinilor toxigene de bacil difteric și tiparea enterotoxinei stafilococice.

. <u>Determinarea toxinogenității bacilului difteric</u> se face prin testul Elek-Ouchterlony-Frobisher (testul E.O.F.): la 100 ml geloză-bază x) topită și răcită la 40-42°C se adaugă 25 ml ser de bou; se toarnă în plăci Petri cu diametrul de 10 cm, cîte 25-30 ml.

Fig. 31 Testul E.O.F.
a,c,e – Tulpini de bacil difteric toxigene; b,d – Tulpini de bacil difteric netoxigene; M – martor pozitiv.

Pe diametrul plăcii se decupează un șanț cu dimensiuni de 7/0,5 cm. După îndepărtarea gelozei din șanț se introduce 0,5 ml antitoxină difterică (ser antidifteric nefenolat furnizat de I.C.)(fig.31) iar plăcile se lasă 2 ore la termostat, cu capacul întredeschis, pentru difuziunea completă a serului; se plombează apoi șanțul cu geloză simplă. Se însămînțează culturile de testat de 24-48 ore de pe mediul Loeffler în striuri perpendiculare pe șanțul care conține antitoxina. Ca martor se însămînțează o tulpină de bacil difteric sigur toxigenă. Plăcile se incubează 24-48 ore la 37°C.

Apariția unei benzi de precipitare în unghiul format de linia de însămînțare și șanțul care conține antitoxină indică o reacție pozitivă.

<u>Identificarea enterotoxinei stafilococice</u>. Pe o lamă de sticlă se repartizează un strat subțire de gel de agar, în care se efectuează mici godeuri. In godeul central se repartizează serul imun de tip (A, B sau D) sau un ser polivalent antienterotoxină stafilococică iar în godeurile periferice filtratul culturilor de testat inactivat 30 minute la 80°C xx). Lamele se mențin acoperite cu capacul unei cutii Petri la temperatura camerei, 1-3 zile, timp în care se citește reacția. In cazul tulpinilor de stafilococ producătoare de enterotoxină se observă apariția liniilor de precipitare (fig.32).

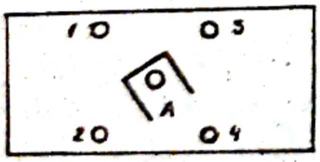


Fig. 32 Tiparea enterotoxinei stafilococice
A – Ser imun de tip A.
1 – enterotoxină martor.
2,3 – tulpini enterotoxigene.
4 – tulpină netoxigenă.

---

x) Geloza-bază se obține prin suspendarea în 100 ml apă distilată a 4,2 g de geloză E.O.F. livrată de I.C.

xx) Prin inactivare sînt distruse toate enzimele și toxinele stafilococice, rămînînd numai enterotoxina care este termorezistentă.

4. Reacţia de neutralizare

Reacţia de neutralizare se bazează pe principiul că în urma interacţiunii cu anticorpii complementari, unele antigene îşi pierd efectele biologice caracteristice: de ex. toxinele şi enzimele sînt neutralizate. Acest aspect va fi exemplificat prin testul de sero-neutralizare efectuat pe şoarece pentru identificarea toxinei botulinice dintr-un aliment: 3 grupuri de cîte 2 şoareci sînt protejate prin inoculare subcutanată a 0,5 ml (300 unităţi antitoxice internaţionale) ser antibotulinic A, B şi respectiv E. După 2-3 ore, celor 3 perechi de şoareci imunizaţi cu ser antibotulinic şi unei perechi martor li se inoculează intraperitoneal 0,5 ml filtrat din alimentul bănuit a conţine toxină botulinică. Toţi şoarecii vor muri cu excepţia unei singure perechi la care toxina inoculată a fost neutralizată de serul antibotulinic administrat anterior. Serul care a realizat protecţia indică serotipul toxinei.

5. Imunoelectroforeza contracurent

Reacţia de imunodublădifuzie a fost mult ameliorată ca rapiditate şi sensibilitate prin practicarea sa într-un cîmp electric. Principiul reacţiei de imunoelectroforeză contracurent (IEP-C) se bazează pe faptul că într-un gel de agar sau agaroză, sub acţiunea curentului electric, antigenele încărcate puternic electronegativ se deplasează către anod iar anticorpii cu încărcătură electrică slab negativă sînt antrenaţi de curentul de electroendosmoză spre catod; dacă există corespondenţă imunologică între antigen şi anticorp, la jumătatea distanţei dintre godeuri, în zona de echivalenţă, va apare o linie de precipitare vizibilă cu ochiul liber sau cu lupa. In cîmp electric, particulele de antigen şi anticorpul difuzează activ şi în totalitate crescînd astfel sensibilitatea reacţiei de 5-10x faţă de difuziunea pasivă în gel.

Cu ajutorul IEP-C pot fi decelate unele antigene polizaharidice solubile microbiene în diferite produse patologice. Astfel s-au putut pune în evidenţă antigenele solubile de N.meningitidis grup A, B şi C, Str.pneumoniae şi H.influenzae serotip b în l.c.r. la persoane cu meningită (inclusiv în cazurile cu examen bacteriologic negativ); de asemenea antigenele polizaharidice pneumococice în sputa şi serul bolnavilor cu pneumonie.

IEP-C s-a mai dovedit utilă pentru identificarea antigene-

Scanned with OKEN Scanner

lor microbiene în culturi: identificarea serogrupurilor de streptococi A, B, C și G, a serotipurilor de Str.pneumoniae și H.influenzae, precum și a toxinogenezei la C.diphtheriae.

Tehnica. Intr-un gel de agar sau agaroză 1%, repartizat pe suprafața unei lame de sticlă, se efectuează o serie de godeuri (cu un anumit diametru și separate printr-o anumită distanță unul de altul). Produsele pentru decelarea antigenelor sînt repartizate în godeurile de lîngă catod iar serurile de referință în godeurile vecine anodului (fig.33). Lamele astfel preparate sînt plasate într-o cuvă de electroforeză și supuse curentului electric de o anumită intensitate. Lectura reacției se face cu ajutorul unei lupe. Un prim rezultat poate fi furnizat într-o oră de la efectuarea reacției iar a doua citire se face după menținerea plăcilor 24-48 ore la 4°C.

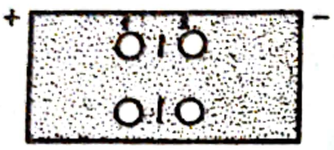


Fig.33 Schema reacției de imunoelectroforeză contracurent.
1 - ser cu anticorpi ; 2 - antigen

6. Reacția de imunofluorescență

Reacția de imunofluorescență, ca metodă de identificare a bacteriilor, folosește anticorpi marcați cu substanțe fluorescente (în special izothiocianat de fluoresceină), preparatele fiind apoi examinate la microscopul cu lumină ultravioletă. Acest procedeu poate fi utilizat pentru identificarea rapidă a unor bacterii în produse patologice: B.pertussis, N.gonorrhoeae, T.pallidum.

a. Metoda directă constă în fixarea specifică pe antigenul de identificat a anticorpului omolog, marcat fluorescent. Complexul Ag-Ac format apare fluorescent la microscopul cu lumină ultravioletă (fig.34).

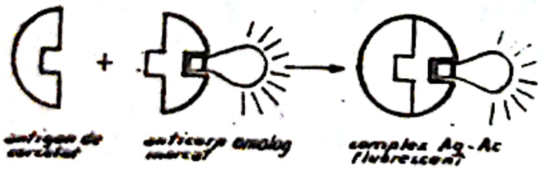


Fig.34 Reacția de imunofluorescență. Metoda directă.

b. Metoda indirectă presupune intervenția unui element suplimentar: serul antiglobulină umană marcat fluorescent.

Reacția se desfășoară în 2 timpi: într-o primă etapă, antigenul (preparat din produs patologic) este pus în prezența anticorpului cunoscut, specific, nemarcat fluorescent. Pentru vizuali-

zarea complexului Ag-Ac format, în a doua etapă a reacției se adaugă serul antiglobulină umană marcat fluorescent care se va fixa pe anticorpul din primul ser imun ce se comportă în acest caz ca antigen (fig.35).

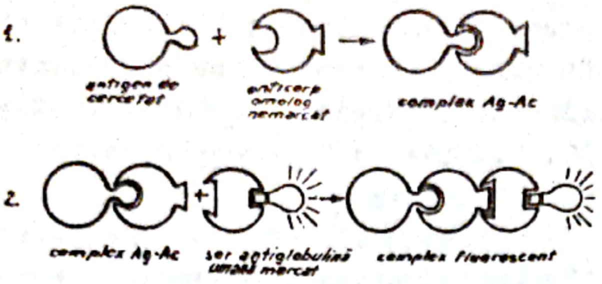


fig. 35 Reacția de imunofluorescență. Metoda indirectă

Metoda indirectă, în dublu strat, este mai frecvent utilizată decît cea directă deoarece necesită un singur reactiv marcat fluorescent, indiferent de antigenul cercetat. In același timp, tehnica indirectă are largi aplicații în serodiagnostic (cap.VI).

F. SENSIBILITATEA LA BACTERIOFAGI

Determinarea sensibilității la bacteriofagi, lizotiparea, permite stabilirea tipului fagic al tulpinii bacteriene izolate. Această metodă are în special importanță epidemiologică precizînd identitatea tulpinilor circulante într-un focar epidemic, originea infecției și filiația îmbolnăvirilor, ceea ce are valoare deosebită în combaterea sau prevenirea unei izbucniri epidemice (de spital, hidrice etc.).

Principiul metodei se bazează pe sensibilitatea specifică și constantă a unei bacterii față de anumiți bacteriofagi. Acest caracter se poate evidenția „in vitro" prin depunerea unei picături din diferite preparate fagice pe o cultură tînără a tulpinii de cercetat, însămînțată pe geloză repartizată în placă Petri. Apariția pe suprafața culturii a unei zone clare de liză corespunzătoare bacteriofagului specific indică lizotipul tulpinii bacteriene investigate.

Tehnică. Pe fundul unei plăci cu agar nutritiv se desenează o grilă subdivizată în mai multe pătrățele corespunzătoare numărului de preparate fagice utilizate. Apoi se inundă suprafața mediului cu cultura de 16-18 ore a tulpinii de testat în bulion. După îndepărtarea excesului de inoculum și uscarea suprafeței mediului, în fiecare pătrățel se depune cu pipeta capilară cîte 0,01 ml din fiecare preparat fagic. Incubare peste noapte la 30°C. A doua zi

Fig. 36 LIZOTIPIA UNEI TULPINI DE S.aureus

se notează pătrățelul în care s-a produs liza culturii bacteriene și în raport cu aceasta se stabilește lizotipul tulpinii testate. In fig. 36, tulpina de S.aureus aparține tipului fagic 80.

Lizotiparea se practică pentru identificarea tulpinilor de S.typhi izolate dintr-un focar epidemic de febră tifoidă, a tulpinilor de S.aureus sau P.aeruginosa cauzatoare de infecții de spital etc.

VI. METODE DE EVIDENTIERE A ANTICORPILOR

Diagnosticul imunologic al bolilor infecţioase se bazează pe specificitatea reacţiei antigen-anticorp şi constă în cercetarea prezenţei anticorpilor la bolnavi faţă de bacteria presupusă infectantă. In cadrul acestor reacţii de diagnostic, anticorpii (antibacterieni, antitoxici, antienzimatici, sensibilizanţi etc.) reprezintă elementul necunoscut iar antigenul (suspensie bacteriană, extract microbian, toxină, enzimă etc.) elementul cunoscut.

Anticorpii apar în general în organism la 8-10 zile de la debutul bolii şi în multe cazuri pot persista luni şi chiar ani de zile după infecţie, permiţînd stabilirea unui diagnostic retrospectiv. Anticorpii mai pot fi prezenţi în organism ca urmare a infecţiilor inaparente sau după vaccinare, aspecte de care trebuie să se ţină seama în interpretarea reacţiilor imunologice de diagnostic.

Cercetarea prezenţei anticorpilor are numeroase indicaţii:

- precizarea diagnosticului în bolile infecţioase în care nu s-a putut izola agentul etiologic;
- confirmarea diagnosticului de boală în cazul bacteriilor condiţionat patogene (evidenţierea anticorpilor faţă de tulpina izolată de la bolnav - autoserodiagnostic);
- stabilirea diagnosticului în boli de sensibilizare;
- aprecierea stării de imunitate a populaţiei (de ex. în scop de vaccinare).

Evidenţierea anticorpilor (umorali şi celulari) se poate face prin metode „in vitro" şi „in vivo".

A. METODE „IN VITRO"

Teste serologice

Decelarea anticorpilor umorali, prin diferite teste serologice, constituie o metodă de bază atît pentru diagnosticul bolilor infecţioase cît şi a bolilor de sensibilizare.

Recoltarea sîngelui pentru examen serologic

Sîngele se recoltează dimineaţa, pe nemîncate, cu o seringă sterilă [x)] prin puncţie venoasă (de obicei din venele de la plica cotului), în cantitate de 5-10 ml. După recoltare, sîngele este trecut aseptic într-o eprubetă sterilă. Se lasă să se coaguleze la temperatura camerei, eprubeta fiind aşezată pe un plan înclinat, şi apoi se menţine o oră la 37°C, pentru o mai bună retractare a cheagului. Cu o pipetă Pasteur sterilă, închisă la vîrf, sau prin agitare se desprinde cheagul format de pe peretele eprubetei şi apoi eprubeta se introduce la frigider la 4°C, cîteva ore sau chiar pînă a doua zi, pentru exprimarea serului. Serul se decantează steril şi dacă mai conţine hematii se centrifughează pentru a fi perfect clar. In cazul în care nu se lucrează imediat, serurile se pot păstra cîteva zile la frigider la 4°C iar pentru o perioadă mai îndelungată de timp la congelator (-25°C). Nu se vor utiliza în reacţie serurile hemolizate sau infectate deoarece pot da reacţii fals pozitive.

Reacţiile Ag-Ac se pot practica prin metode calitative şi cantitative.

O reacţie calitativă pozitivă indică prezenţa anticorpilor în ser faţă de un anumit antigen, fără a putea preciza însă dacă este vorba de o experienţă imunologică recentă sau trecută.

Rezultatele obţinute printr-o reacţie cantitativă sînt mult mai semnificative pentru diagnostic deoarece permit aprecierea cantitativă a anticorpilor, stabilirea titrului serului. Practicînd reacţia cu diluţii progresive de ser se poate evidenţia titrul anticorpilor care este reprezentat de diluţia maximă de ser la care se mai produce o reacţie pozitivă.

Cel mai adesea legătura cauzală între anticorpii decelaţi şi infecţia investigată necesită cercetarea anticorpilor în dinamică, pe 2 probe de ser: una precoce (ser I), recoltată în prima săptămînă de boală, şi alta tardivă (ser II), după 10-14 zile. Creşterea titrului anticorpilor de cel puţin 4x în proba tardivă

[x)] Sticlăria utilizată pentru serodiagnostic (seringi, eprubete) va fi sterilizată la autoclav iar anterior folosirii va fi clătită cu soluţie salină izotonă pentru a preveni hemoliza sîngelui.

faţă de cea precoce are valoare diagnostică, relevînd o sinteză activă de anticorpi consecutiv stimulării antigenice realizată de prezenţa bacteriei în organism.

Reacţiile cantitative repetate, la acelaşi bolnav, permit stabilirea unei curbe a dinamicii anticorpilor care poate da indicaţii asupra caracterului evolutiv sau regresiv al unei infecţii.

Pentru diagnosticul serologic al bolilor infecţioase exemplificăm cîteva reacţii Ag-Ac: reacţia de aglutinare, reacţia de fixare a complementului, reacţia de precipitare şi reacţia de imunofluorescenţă indirectă.

1. Reacţia de aglutinare

Reacţia de aglutinare permite evidenţierea şi stabilirea titrului anticorpilor aglutinanţi serici faţă de antigene cunoscute, reprezentate de o suspensie microbiană.

Pentru exemplificare redăm reacţia de aglutinare serică calitativă, folosită în serodiagnosticul febrei tifoide şi a febrelor paratifoide, care permite cercetarea separată a anticorpilor aglutinanţi anti-O şi anti-H faţă de antigenele corespunzătoare somatice O şi flagelare H aparţinînd tulpinilor de S.typhi, S.paratyphi A şi S.schottmuelleri (S.paratyphi B).

Elementele reacţiei:

- ser de cercetat, 2 probe recoltate la 10-14 zile interval;
- diluent: soluţie salină izotonă tamponată la pH 7;
- baterie de antigene O şi H pentru S.typhi, S.paratyphi A şi S.paratyphi B, reprezentate de suspensii microbiene inactivate prin alcoolare şi respectiv formolare.

Tehnica reacţiei. Din serul de cercetat se fac 2 diluţii: 1/10 şi 1/100 în soluţie salină izotonă şi se repartizează conform tabelului III, în 6 şiruri de tuburi. In primele 3 serii se adaugă suspensiile antigenice formolate (TH, AH, BH) iar în celelalte 3 serii suspensiile alcoolate (TO, AO, BO), diluate după indicaţiile de pe flacon, în volum de 0,6 ml. Ultimul tub al fiecărei serii este martorul antigen (conţine numai soluţie salină izotonă şi antigenul) (tabelul III).

Se agită tuburile şi se incubează la 52°C timp de 2 ore

pentru aglutinarea de tip H şi 18-20 ore pentru aglutinarea de

TABEL III SCHEMA REACŢIEI SERICE CALITATIVE

Numărul tubului	1	2	3	4	5	6	7
Ser de cercetat dil. 1/10	0,4	0,2	0,1	—	—	—	—
Ser de cercetat 1/100	—	—	—	0,4	0,2	0,1	—
Sol. salină izotonă	—	0,2	0,3	—	0,2	0,3	0,4
Suspensie de antigen (O sau H)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Diluţia finală	1/25	1/50	1/100	1/250	1/500	1/1000	Martor

tip O. Citirea se face după menţinerea tuburilor încă 10 minute la temperatura camerei.

Aglutinarea H se produce repede, cu formarea unui sediment bogat; prin agitarea uşoară a tubului se observă floccoane mari, pufoase, asemănătoare fulgilor de zăpadă, uşor dislocabile.

Aglutinarea O are loc mai încet iar sedimentul este redus; aglutinatele apar sub formă de grunji mici, ca firele de nisip, care se desfac greu prin agitare.

Titrul aglutinant al serului este reprezentat de diluţia maximă la care se mai observă fenomenul de aglutinare. Seria de tuburi în care se va obţine o reacţie pozitivă la titrul cel mai ridicat va indica agentul etiologic al infecţiei enterice investigate. In general, în cazul febrei tifoide un titru O de 1/250 la bolnavii nevaccinaţi este sugestiv pentru diagnostic. Certitudinea este asigurată de creşterea titrului anticorpilor de cel puţin 4x în cursul evoluţiei bolii.

2. Reacţia de aglutinare pasivă

Reacţia de aglutinare pasivă sau condiţionată este mai sensibilă, putînd evidenţia cantităţi foarte mici de anticorpi. In reacţie se foloseşte un antigen solubil, fixat pe un suport particulat, care aglutinează vizibil în prezenţa anticorpului omolog.

Ca suport se pot utiliza diferite particule insolubile, inerte (colodiu, latex, bentonită etc.) sau hematii umane grup O sau animale - reacţia de hemaglutinare pasivă.

Adsorbţia antigenului pe hematii se poate realiza prin contact direct - fixare spontană (ex. antigene polizaharidice), după ce hematiile au fost în prealabil tratate cu diferite substanţe

chimice (acid tanic, săruri de crom, glutaraldehidă etc.) - fixare chimică (ex. antigene proteice), sau prin alte procedee, de ex. - fixare imunologică.

Reacţia de hemaglutinare pasivă are aplicaţii în serodiagnosticul sifilisului, al tifosului exantematic, în boli prin autoanticorpi etc.

3. Reacţia de precipitare

Una din reacţiile de precipitare aplicate în serodiagnostic este reacţia de floculare tip VDRL (Veneral Diseases Research Laboratory) cu antigen cardiolipinic [x)] care permite evidenţierea anticorpilor antilipoidici în sifilis. Reacţia se poate executa calitativ şi cantitativ în tuburi sau plăci cu godeuri.

Redăm pentru exemplificare reacţia VDRL calitativă efectuată în plăci cu godeuri.

Elementele reacţiei:

- antigen cardiolipinic tip VDRL diluat, conform indicaţiilor, în soluţie salină formolată, tamponată la pH 6;
- seruri de cercetat clare şi nehemolizate, inactivate 30 minute la 56°C (baie de apă);
- plăci cu godeuri de 16 mm ø /1,75 mm adîncime;
- seringi semiautomate, reglate pentru distribuirea unei cantităţi de 0,05 ml ser;
- seringă specială reglată pentru repartizarea antigenului: o picătură = 1/60 ml.

Tehnica reacţiei. In fiecare godeu al plăcii se repartizează cîte un ser de cercetat în cantitate de 0,05 ml şi apoi se adaugă cîte o picătură de antigen. Agitare timp de 4 minute prin rotirea plăcii pe masa de lucru, în plan orizontal.

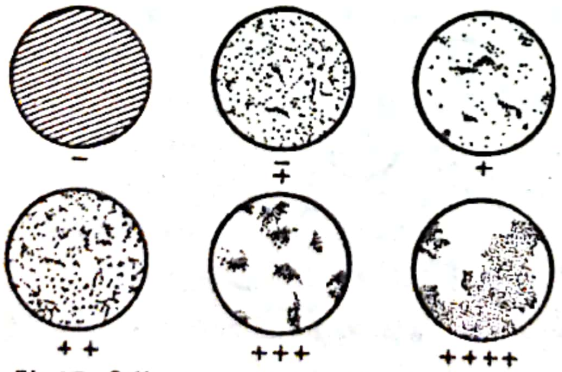


Fig.37 Citirea reacţiei VDRL (mărire 100x)

In reacţie sînt incluşi o serie de martori: ser sigur pozitiv, ser sigur negativ şi martor antigen.

Citirea reacţiei se face cu ajutorul lupei (fig.37).

---

x) Extract alcoolic purificat din cord de bou.

Reacţia pozitivă se notează cu unul sau mai multe plusuri (+ .... ++++) în raport cu mărimea precipitatului (flocoane) şi claritatea lichidului.

Reacţia negativă = lichid omogen opalescent, fără flocoane.

Serurile pozitive prin această metodă, indiferent de intensitatea reacţiei, vor fi retestate în testul VDRL cantitativ (cu diluţii de ser).

4. Reacţia de fixare a complementului

Principiu. Reacţia de fixare a complementului (RFC) se bazează pe capacitatea unor complexe imune Ag-Ac de a fixa complementul sau alexina.

Complementul (C) este un sistem citolitic potenţial, constituit din 11 substanţe proteice, termolabil (se distruge în 30 minute la 56°C), prezent în serul normal al omului şi animalelor. In cazul unor bacterii (ex. vibrionul holeric), fixarea C pe cuplul imun este vizibilă „in vitro" printr-un fenomen de liză (bacterioliză). La majoritatea bacteriilor însă fixarea C nu poate fi observată, de aceea pentru a decela consumarea sa se introduce în reacţie un al doilea cuplu specific Ag-Ac care, prin fixarea C, se modifică vizibil; este vorba de cuplul hemolitic (CH) constituit din hematii de berbec sensibilizate cu ser hemolitic de iepure antihematii de berbec.

In concluzie, RFC se realizează prin utilizarea a 2 cupluri Ag-Ac: cuplul de testat şi cuplul indicator - sistemul hemolitic, care îşi dispută ca element comun C (fig.38).

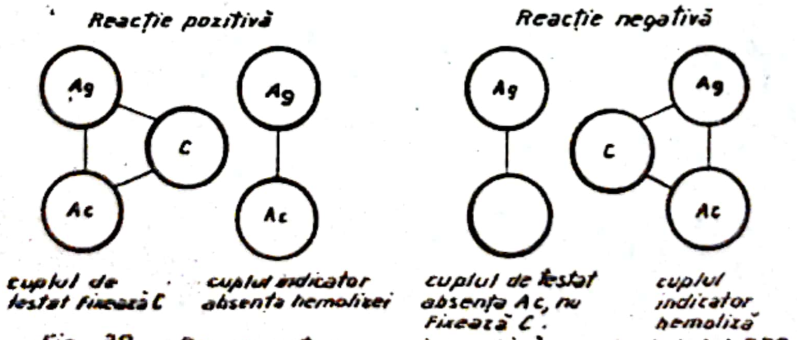


Fig. 38 Reprezentare schematică a principiului RFC.

Reacţia se efectuează în 2 timpi: într-o primă etapă are loc reacţia dintre antigenul şi anticorpul din cuplul de testat,

în prezența unei cantități determinate de C, iar în al doilea timp se introduce CH. In cazul în care antigenul și anticorpul din cuplul de testat își corespund specific se formează complexul Ag-Ac care fixează C și CH rămîne nehemolizat: absența hemolizei = reacție pozitivă. Dacă în cuplul testat cele două elemente nu-și corespund specific, C rămîne liber și se fixează, în al doilea timp al reacției, pe cuplul indicator determinînd liza hematiilor: prezența hemolizei = reacție negativă.

RFC are largi aplicații în diagnosticul serologic al bolilor infecțioase bacteriene (ex. sifilis, leptospiroză). Ea se poate practica prin metode calitative sau cantitative în plăci din material plastic cu godeuri.

In continuare vom prezenta RFC cantitativă pentru serodiagnosticul sifilisului cu antigen cardiolipinic sau treponemic (antigen proteic de grup Reiter), - tehnica Kolmer.

Elementele reacției:

- ser de cercetat, inactivat 30 minute la 56°C, pentru decomplementare;
- antigen cardiolipinic sau treponemic standardizat și diluat conform indicațiilor de pe flacon;
- C: se găsește în serul proaspăt recoltat de la orice animal; de obicei se folosește serul de cobai cu un conținut mai uniform în C. Complementul se poate utiliza proaspăt sau conservat după metoda Richardson;
- suspensie de hematii de berbec 1,5% în soluție salină izotonă;
- ser hemolitic anti-hematii de berbec, preparat pe iepure; serul se inactivează pentru decomplementare;
- diluent: soluție salină izotonă tamponată la pH 6,8-7,4, conținînd ioni de calciu și magneziu.

Toate elementele folosite în RFC sînt utilizate în anumite cantități stabilite prin titrare.

Tehnica reacției. Se fac diluții duble din serul de cercetat (1/4, 1/8, 1/16 ....), în volum de 0,1 ml x), într-un șir de

---

x) Toate elementele reacției se repartizează cu seringa automată, schimbîndu-se pentru fiecare pipeta de distribuire.

godeuri; se adaugă antigenul şi C cîte 0,1 ml din diluţiile stabilite prin titrare (fig.39).

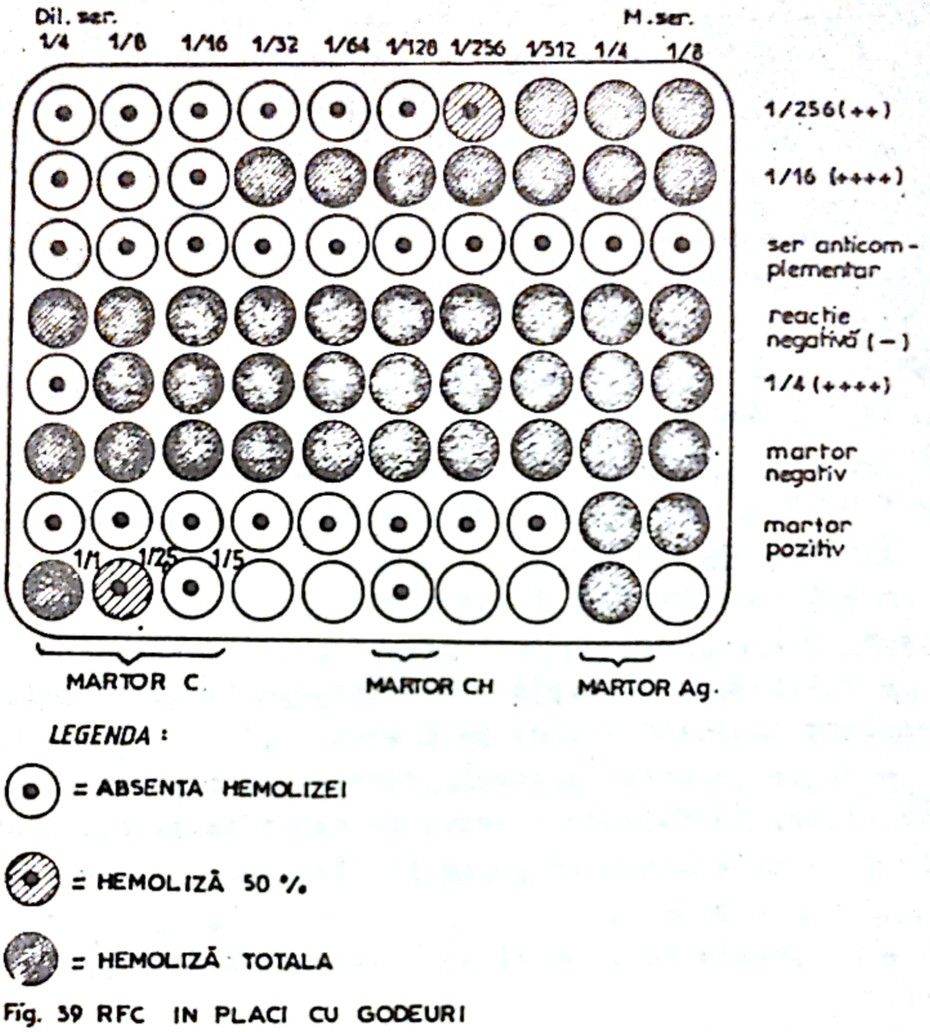


Fig. 39 RFC IN PLACI CU GODEURI

Reacţia se incubează 18 ore la frigider la 4°C.

In al doilea timp al reacţiei se adaugă CH titrat, în volum de 0,1 ml; plăcile se agită pentru omogenizarea amestecului, după care se menţin 30 minute la 37°C şi apoi în continuare la frigider pînă a doua zi.

Pentru fiecare ser de cercetat se efectuează un <u>martor ser</u> (ser de cercetat + C + CH) cu scopul de a verifica dacă acesta nu este anticomplementar [x]. Anticomplementaritatea apare în cazul serurilor hemolizate, infectate, cu urme de substanţe medica-

---

[x] Serurile anticomplementare fixează C în absenţa antigenului.

mentoase etc., situație în care reacția va fi repetată cu o nouă probă de ser.

Pentru verificarea elementelor utilizate în reacție, se mai efectuează o serie de martori:

- martor antigen (Ag + C + CH), care trebuie să demonstreze că în diluția folosită în reacție antigenul nu este anticomplementar;
- martor complement (C în diferite diluții + CH), care verifică dacă cantitatea de C utilizată în reacție este capabilă să producă hemoliza 50% a globulelor roșii;
- martor hematii sensibilizate (CH + diluent), ce controlează dacă hematiile corespund calitativ și nu hemolizează spontan în prezența diluentului;
- martor ser pozitiv;
- martor ser negativ.

Exprimarea rezultatelor se face în raport cu intensitatea hemolizei, mărimea sedimentului globular și aspectul lichidului supernatant. Astfel:

- hemoliză totală, completă, cu absența sedimentului globular = reacție negativă (-);
- hemoliză aproape completă, sediment globular foarte redus, lichid supernatant colorat în roșu intens = reacție slab pozitivă (+);
- hemoliză parțială 50% (sediment globular cu lichid supernatant colorat în roșu) = reacție pozitivă (++);
- absența totală a hemolizei, sediment compact de hematii, lichid supernatant incolor = reacție intens pozitivă (++++).

Titrul serului de cercetat este indicat de ultima diluție care a determinat o depunere a 50% din cantitatea de hematii sensibilizate, restul hematiilor fiind lizate.

5. Reacția de neutralizare

Acest tip de reacție poate fi exemplificat prin reacția ASLO care evidențiază anticorpii antistreptolizină O ce apar în serul persoanelor după infecții streptococice. Ea se bazează pe principiul că majoritatea tulpinilor de Str.pyogenes elaborează o hemolizină antigenică - streptolizina O, a cărei efect hemolitic este neutralizat de anticorpii corespunzători - antistrepto-

lizine O (vezi cap.IX, pag.   ).

6. Reacţia de imunofluorescenţă

Reacţia de imunofluorescenţă, tehnica indirectă, este o metodă sensibilă de diagnostic serologic a bolilor infecţioase. Ea se efectuează în 2 timpi:

i. frotiul care conţine un antigen cunoscut se acoperă cu serul de cercetat; se incubează;

ii. frotiul se acoperă cu un ser anti-globulină umană marcat fluorescent; se incubează.

Dacă anticorpul corespunde antigenului din frotiu se formează un complex antigen-anticorp care va reacţiona cu serul anti-globulină umană marcat fluorescent devenind vizibil la microscopul cu radiaţii ultraviolete (fig.40).

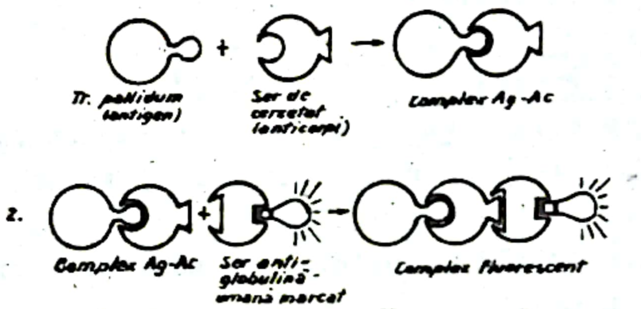


Fig.40 Reacţia de imunofluorescenţă
Metoda indirectă.

Un exemplu de aplicare a acestei metode în bacteriologie este testul de imunofluorescenţă utilizat în diagnosticul serologic al sifilisului.

B. METODE „IN VIVO"

Teste biologice

Metodele „in vivo" permit atît cercetarea stării de sensibilizare de tip imediat (anticorpi umorali) sau de tip întîrziat (anticorpi celulari) cît şi a stării de imunitate (rezistenţă specifică antiinfecţioasă) a organismului faţă de stimulul antigenic. Aceste metode de diagnostic se realizează prin inocularea intradermică a antigenului cauzal (bacterie, toxină, medicamente, ser imun de cal etc.).

a. Evidenţierea stării de sensibilizare de tip întîrziat

Starea de sensibilizare de tip întîrziat poate fi decelată

prin intradermoreacţie (IDR) în unele infecţii bacteriene ca: tuberculoză, lepră, sifilis, bruceloză etc.

IDR poate fi utilă în stabilirea diagnosticului de boală dacă se pozitivează precoce sau dacă surprindem bolnavul într-o perioadă tardivă a bolii în care alte procedee de investigaţie microbiologică dau rezultate negative. In general însă starea de sensibilizare alergică apare tîrziu, după 4-8 săptămîni, în cursul evoluţiei bolii şi persistă luni sau chiar ani de zile după vindecare, de aceea IDR are, cel mai adesea, valoarea unei metode de diagnostic retrospectiv.

IDR se practică prin inocularea pe faţa anterioară a antebraţului, în 1/3-mijlocie, strict intradermic, a 0,1 ml antigen (suspensie sau extract microbian). Citirea reacţiei se face după 24-72 ore (în funcţie de antigenul utilizat) notîndu-se în mm diametrul zonei de eritem şi/sau infiltraţie apărut la locul inoculării = reacţie pozitivă. Reacţia este negativă dacă nu se constată nici o modificare la locul injecţiei sau cel mult există o hiperemie care dispare după 24 ore. O reacţie negativă exclude infecţia cu microbul corespunzător. Surprinderea virajului reacţiei faţă de un antigen de la negativ la pozitiv permite stabilirea cu certitudine a etiologiei infecţiei.

b. <u>Evidenţierea stării de imunitate</u>

Cercetarea stării de imunitate prin IDR se utilizează mai mult în scop epidemiologic, pentru depistarea persoanelor susceptibile la o anumită infecţie, în vederea vaccinării, de ex.reacţia Schick în difterie. Această testare se bazează pe principiul reacţiei de neutralizare a toxinei de către antitoxina prezentă în organismul imun şi constă în injectarea pe cale intradermică la antebraţul drept a 0,2 ml toxină difterică care conţine 1/50 DLM cobai; la antebraţul stîng se inoculează aceeaşi cantitate de toxină inactivată prin încălzire (20 minute la 80 ^{0}C) care va servi ca martor.

Citirea reacţiei se face după 48 ore. Evidenţierea unei zone congestiv-infiltrative cu diametrul de minimum 10 mm, la locul de inoculare a toxinei, denotă că persoana respectivă este receptivă la infecţie (nu are antitoxină circulantă, cel puţin 0,03 UAI/ml) şi deci trebuie vaccinată.

Scanned with OKEN Scanner

VII. METODE DE LABORATOR IN CONDUCEREA ANTIBIOTICOTERAPIEI

Mult timp rolul laboratorului de microbiologie s-a limitat la stabilirea diagnosticului etiologic în infecțiile microbiene. De la descoperirea antibioticelor și chimioterapicelor, responsabilitatea medicului microbiolog s-a extins în egală măsură la tratamentul infecțiilor. Determinarea sensibilității la antibiotice a bacteriei infectante cît și dozarea concentrației substanțelor antimicrobiene în umori la bolnav au devenit metode de bază în conducerea științifică a antibioticoterapiei.

A. DETERMINAREA SENSIBILITATII BACTERIILOR LA ANTIBIOTICE (A n t i b i o g r a m a)

Antibiograma (ATB) sau cercetarea sensibilității unei bacterii la antibiotice și chimioterapice se realizează punînd în contact „in vitro" tulpina microbiană de testat cu doze variate din substanța antimicrobiană. Relația microb-antibiotic poate fi determinată în laborator prin stabilirea a 2 valori: concentrația minimă inhibitorie (CMI) și concentrația minimă bactericidă (CMB).

CMI = cea mai mică cantitate de antibiotic care inhibă în 18 ore creșterea vizibilă a unui inoculum bacterian standardizat.

CMB = cea mai mică cantitate de antibiotic care omoară microbii, din inoculum utilizat, în proporție de 100-99,9%.

Pentru ca un antibiotic să fie util în tratamentul unei infecții este necesar să realizeze în organismul bolnavului, la nivelul focarului de infecție, concentrații antimicrobiene active. Cu cît aceste concentrații sînt mai mari în raport cu CMI (respectiv CMB) a bacteriei infectante cu atît antibioticul este mai eficace iar microbul este considerat, din punct de vedere terapeutic, ca fiind mai sensibil.

In mod obișnuit prin raportarea CMI a bacteriei infectante

la nivelul seric mediu al antibioticului x), obţinut cu doze terapeutice uzuale, se pot grupa microbii testaţi prin ATB în 3 categorii:

- „sensibili" = CMI este de 2-4x mai mică faţă de nivelul seric mediu al antibioticului; efectul terapeutic poate fi obţinut cu doze uzuale ale acestui antibiotic;

- „rezistenţi" = CMI este mai mare decît nivelul seric mediu al antibioticului; efectul terapeutic nu poate fi obţinut;

- „moderat rezistenţi" = CMI este apropiat de nivelul seric mediu al antibioticului; efectul terapeutic se poate eventual obţine cu doze mari de antibiotic (dacă nu este toxic) sau prin administrarea sa locală.

In practica de laborator, testarea sensibilităţii bacteriei la antibiotice se realizează prin 2 metode de bază:

- metoda difuzimetrică, şi
- metoda diluţiilor.

Indiferent de metodă, în efectuarea ATB intervin o serie de factori ca: natura mediului de cultură, puritatea şi concentraţia inoculum bacterian, proprietăţile antibioticului, timpul de incubare etc., factori care vor trebui utilizaţi în condiţii standardizate pentru a asigura interpretarea corectă a rezultatelor, precum şi reproductibilitatea acestora. In acelaşi scop este necesar ca, în paralel cu testarea tulpinii de cercetat, să se efectueze ATB unei tulpini microbiene de referinţă (martor). Tulpinile de referinţă sînt tulpini de colecţie care şi-au păstrat spectrul natural de sensibilitate la antibiotice, de exemplu:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), utilizat pentru testarea sensibilităţii bacteriilor gram-pozitive, sau

- *Escherichia coli* (ATCC 25922), folosită în cazul testării sensibilităţii bacililor gram-negativi.

1. Metoda difuzimetrică

Metoda difuzimetrică (calitativă) reprezintă metoda de rutină pentru efectuarea ATB, permiţînd testarea concomitentă a bacteriei faţă de mai multe antibiotice. Această metodă este indicată

---

x) In cazul infecţiilor urinare, meningiene, biliare, CMI a bacteriei patogene este raportată la concentraţiile active de antibiotic realizate în urină, l.c.r., bilă.

Scanned with OKEN Scanner

numai pentru bacteriile cu creștere rapidă [x)].

Antibiograma se efectuează în general după izolarea microorganismelor în cultură pură - antibiogramă pe cultură secundară (ACS) dar în cazul produselor monomicrobiene, cu o densitate suficientă a bacteriei infectante la examenul microscopic, este indicată antibiograma pe cultură primară [xx)] (ACP) care are avantajul rapidității rezultatelor.

Principiul metodei. Pe suprafața unui mediu de cultură solid (ex. agar Mueller-Hinton) repartizat în placă Petri, însămînțat uniform cu bacteria de testat, se depun microcomprimate cu diferite antibiotice în concentrații similare celor obținute în ser cu doze terapeutice uzuale. Substanța antimicrobiană activă difuzează în mediu, prezentînd o scădere constantă a gradientului de concentrație de la marginea discului către periferie. După o incubare de 18-20 ore la 37°C se măsoară zona de inhibiție a dezvoltării culturii; în această zonă antibioticul realizează CMI pentru bacteria testată. Cu cît CMI este mai redusă (adică cantitatea de antibiotic necesară inhibiției dezvoltării bacteriei este mai mică) cu atît zona de inhibiție este mai mare și deci bacteria mai sensibilă și invers.

Dintre multiplele tehnici bazate pe acest principiu, pentru standardizare în țara noastră au fost propuse metoda Kirby-Bauer și metoda comparativă minimală Balș.

a. Metoda Kirby-Bauer

i. Materialul necesar:

- mediul de cultură: agar Mueller-Hinton (MH) cu pH 7,2-7,4 repartizat în plăci Petri sterile cu diametrul de 10 cm (25-28 ml mediu) sau 15 cm (50-60 ml mediu) și cu fundul perfect plat; pentru testarea bacteriilor pretențioase nutritiv, la mediul MH se adaugă sînge de oaie în proporție de 5%;

- bacteria de testat: dintr-o cultură tînără de 18-24 ore pe mediu solid, se prelevă cu ansa 4-5 colonii și se prepară o suspensie microbiană în soluție salină izotonă a cărei opacitate

---

[x)] ATB pentru mycobacterii, ca și pentru microbii anaerobi, se practică prin metode speciale care vor fi descrise la capitolele respective.

[xx)] Cultura primară = prima însămînțare a produsului patologic.

se standardizează nefelometric, comparativ cu un tub martor x).
In cazul ACP, inoculum se standardizează în raport cu numărul de bacterii observat la examenul microscopic al frotiului efectuat din produsul patologic xx);

- trusa de comprimate: fiecare microcomprimat conţine o anumită concentraţie de substanţă activă antimicrobiană raportată la nivelul realizat de aceasta în umori cu doze terapeutice uzuale; el are un diametru de 6 mm şi este notat cu simbolul antibioticului. Pentru efectuarea ATB, setul de microcomprimate se alege în funcţie de bacteria de testat xxx) şi localizarea infecţiei (infecţii sistemice, urinare, digestive etc.).

ii. Tehnica reacţiei. Pe suprafaţa uscată a mediului, se însămînţează uniform bacteria de testat cu ajutorul unui tampon steril muiat în suspensia microbiană standardizată. După 5-10 minute (timp necesar pentru uscarea plăcilor inoculate) se aplică microcomprimatele cu o pensă fină, presînd uşor fiecare rondelă pe suprafaţa agarului; la depunerea rondelelor se va respecta distanţa de 15 mm de la marginea plăcii şi de 30 mm între acestea. După o perioadă necesară pentru predifuzia antibioticului (aproximativ 15 minute), plăcile sînt incubate cu capacul în jos, la 37°C, 18-20 ore.

In paralel se efectuează, în condiţii identice, şi testarea tulpinii de referinţă, pentru controlul de calitate al ATB (mediul, microcomprimatele etc.) şi exprimarea corectă a rezultatelor.

iii. Citirea şi exprimarea rezultatelor. Citirea ATB se face măsurînd diametrul zonei de inhibiţie în mm, cu ajutorul unei

---

x) Martorul nefelometric se prepară amestecînd 0,5 ml dintr-o soluţie de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,175 g% cu 99,5 ml H_2SO_4

xx) Pentru a se putea practica ACP trebuie să existe cel puţin o bacterie/cîmp microscopic

xxx) De ex. testarea stafilococilor se face faţă de: Penicilină (P), Oxacilină (O), Eritromicină (E), Cefalotină (Ct), Rifampicină (R), Pristinamicină (Pr), Lincomicină (L), Novobiocină (No), Gentamicină (G), Cloramfenicol (C), Tetraciclină (T), iar a enterobacteriilor faţă de: Ampicilină (A), Cefalotină (Ct), Gentamicină (G), Kanamicină (K), Cloramfenicol (C), Streptomicină (S), Tetraciclină (T), Colimicină (Co), Cotrimoxazol (Cot), Acid nalidixic (Nx) şi Nitrofurantoină (Nf).

rigle: dacă mediul este transparent, citirea se face direct pe fundul plăcii, în lumină reflectată, în timp ce în cazul plăcilor cu agar-sînge, măsurarea diametrului se realizează la suprafața mediului (fig.41).

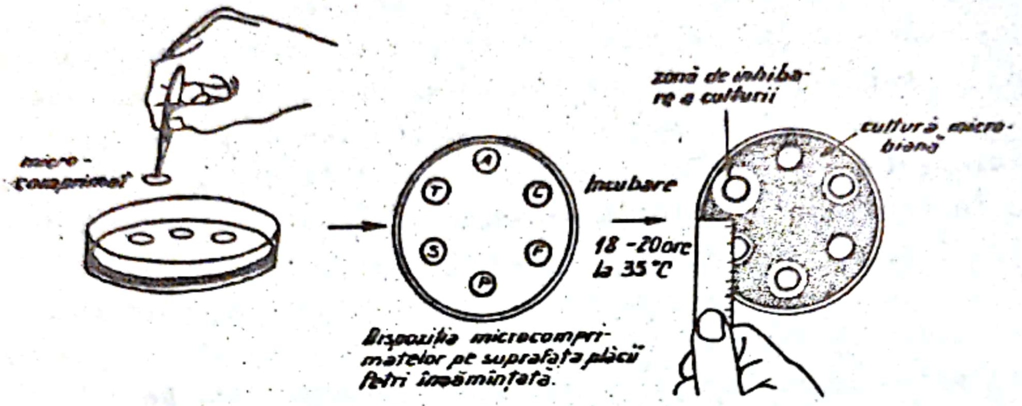


Fig. 41 Metoda difuzimetrică

Exprimarea rezultatelor în buletinul de analiză se face raportînd mărimea zonei de inhibiție la standardele diametrelor critice pentru diferite antibiotice (tabelul IV), ceea ce permite definirea tulpinilor ca sensibile, moderat (intermediar) rezistente și rezistente.

b. <u>Metoda comparativă minimală Balș</u>

Această metodă este mai economică și are avantajul de a permite controlul calității mediului de cultură și a microcomprimatelor prin testarea concomitentă, pe aceeași placă, a tulpinii de cercetat și a bacteriei de referință.

Folosind același mediu, <u>inoculum</u> bacterian și microcomprimate ca în tehnica precedentă, se însămînțează tulpina de testat în partea centrală a cutiei Petri, sub forma unei benzi transversale, de 4-5 cm înălțime, iar deasupra și dedesubtul ei tulpina de referință. Microcomprimatele se depun pe interlinia dintre zonele însămînțate (fig.42).

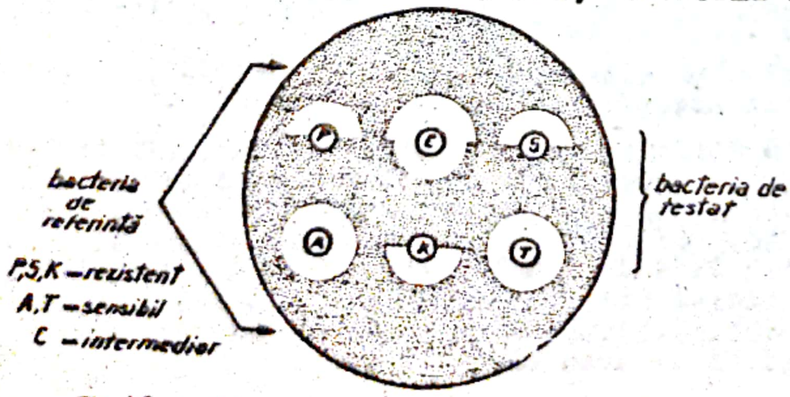


Fig.42 Antibiograma comparativă minimală Balș

Tabel IV

Standardele diametrelor critice în metoda Kirby-Bauer, comparativ cu cele date de microcomprimatele propuse pentru utilizare în R.S.R.

Nr. crt.	ANTIBIOTICUL	Conținutul pe disc sau microcomprimat		Zona de inhibiție în mm					
				Rezistent		Intermediar		Sensibil	
		K–B	RSR	K–B	RSR	K–B	RSR	K–B	RSR
1	Penicilina G Testare stafilococ	10 u	10 u	≤20	≤20	21–28	21–28	≥29	≥29
	Testare alți germeni	10 u	10 u	≤11	≤11	11–21	12–19	≥22	≥20
2	Meticilina (ptr. stafilococ)	5 mcg	–	≤9	–	10–13	–	≥14	–
3	Oxacilina	1 mcg	5 mcg	≤10	≤10	11–12	11–13	≥13	≥14
4	Ampicilina Haemophilus	10 mcg	10 mcg	≤19	≤19	–	–	≥20	≥20
	Testare bacili gram-neg. și enterococ	10 mcg	10 mcg	≤11	≤12	12–13	13–14	>14	≥15
	Staf. și germ. sensibili la Penicilină	10 mcg	10 mcg	≤20	≤16	21–28	17–24	≥29	≥25
5	Carbenicilina Testare Proteus și E. coli	50 mcg	–	≤17	–	18–22	–	≥23	
	Testare Pseudomonas	50 mcg	–	≤12	–	13–14	–	≥15	–
6	Cefalotina	30 mcg	–	≤14	–	15–17	–	≥18	–
7	Streptomicina	10 mcg	50 mcg	≤11	≤12	12–14	13–16	≥15	≥17
8	Neomicina	30 mcg	30 mcg	≤12	≤12	13–16	13–16	≥17	≥17
9	Kanamicina	30 mcg	30 mcg	≤13	≤12	14–17	13–17	≥18	≥18
10	Gentamicina	10 mcg	–	≤12	–	13–14	–	≥15	–
11	Cloramfenicol	30 mcg	50 mcg	≤12	≤11	13–17	12–17	≥18	≥18
12	Tetraciclina	30 mcg	50 mcg	≤14	≤15	15–18	16–19	≥19	≥20
13	Eritromicina	15 mcg	27 mcg	≤13	≤12	14–17	13–18	≥18	≥19
14	Novobiocina	30 mcg	10 mcg	≤17	≤12	18–21	13–17	≥22	≥18
15	Lincomicina	2 mcg	12 mcg	≤ 9	≤12	10–14	13–16	≥15	≥17
16	Pristinamicina	–	15 mcg	–	≤12	–	13–15	–	≥16
17	Clindamicina	2 mcg	–	≤14	–	15–16	–	≥17	–
18	Rifampicina	–	6 mcg	–	≤12	–	13–16	–	≥17
19	Polimixina	300 u	30 mcg	≤ 8	≤ 8	9–11	9–11	≥12	≥12
20	Colistina	10 mcg	30 mcg	≤ 8	≤ 8	9–10	9–10	≥11	≥11
21	Furazolidona	–	30 mcg	–	≤11	–	12–15	–	≥16
22	Nitrofurantoina	300 mcg	10 mcg 200 mcg	≤14	≤12	15–18	13–15	≥19	≥16
23	Acid nalidixic	30 mcg	40 mcg 300 mcg	≤13	≤12	14–18	13–15	≥19	≥16
24	Sulfonamida	250 mcg 1 000 mcg	30 mcg 1 000 mcg	≤12	≤12	13–16	13–16	≥17	≥17
25	Cotrimoxazol	25 mcg	–	≤10	–	11–15	–	≥16	–

După 18-20 ore de incubare a plăcii la 37°C se măsoară în mm raza zonei de inhibiţie obţinută pentru fiecare antibiotic la tulpina de testat, comparativ cu tulpina de referinţă. Se apreciază tulpina de cercetat ca:

- sensibilă dacă raza ariei de inhibiţie este egală sau mai mare decît a bacteriei de referinţă;
- moderat (intermediar) rezistentă dacă raza ariei de inhibiţie este mai mică decît a tulpinii de referinţă; şi
- rezistentă dacă zona de inhibiţie este absentă.

2. Metoda diluţiilor

Metoda diluţiilor (cantitativă) permite determinarea precisă a CMI şi CMB de antibiotic. Ea este indicată în clinică pentru testarea tulpinilor bacteriene izolate din cazuri mai dificile de tratat, de ex.: infecţii de lungă durată fără răspuns la o antibioticoterapie aparent adecvată, septicemii, endocardite, meningite etc.

Determinarea CMI de antibiotic prin metoda diluţiilor în mediu lichid

Principiul metodei. Determinarea CMI se realizează prin efectuarea de diluţii succesive de antibiotic într-un mediu de cultură lichid x), însămînţat cu bacteria de testat, şi stabilirea celei mai mici concentraţii de antibiotic care inhibă dezvoltarea acesteia. Pentru antibioticele cu acţiune bactericidă, stabilirea CMB se va face prin treceri pe medii solide fără antibiotic din tuburile în care nu există cultivare evidentă şi efectuarea numărătorii bacteriilor care mai supravieţuiesc. Diluţia de antibiotic care distruge, în proporţie de 100-99,9%, bacteriile din inoculum iniţial reprezintă CMB.

Tehnica reacţiei. Intr-un şir de eprubete de 12 mm Ø, sterile, se fac diluţii duble de antibiotic în mediu lichid (ex. bulion MH), numărul de diluţii corespunzînd gamei de concentraţii serice xx) care pot fi realizate cu doze terapeutice uzuale ale di-

---

x) Determinarea CMI se poate realiza şi prin efectuarea diluţiilor de antibiotic în medii solide (ex. agar MH) repartizate în plăci Petri; această metodă este mai economică deoarece permite testarea mai multor tulpini, pentru aceeaşi concentraţie de antibiotic, pe o singură placă

xx) Pentru bacteriile izolate din infecţii urinare sau meningite, diluţiile se fac în raport cu concentraţiile de antibiotic ce se pot obţine în urină sau l.c.r.

feritelor antibioticee. Tuburile se însămînțează apoi cu 0,05 ml din diluția 1:1000 a unei culturi de 6 ore în bulion glucozat 2‰ (sau în MH lichid) a bacteriei de testat. In reacție se utilizează 2 martori: unul pentru controlul sterilității mediului (M_1=mediu neînsămînțat) și altul pentru controlul dezvoltării bacteriei (M_2=mediu însămînțat, fără antibiotic) (fig.43).

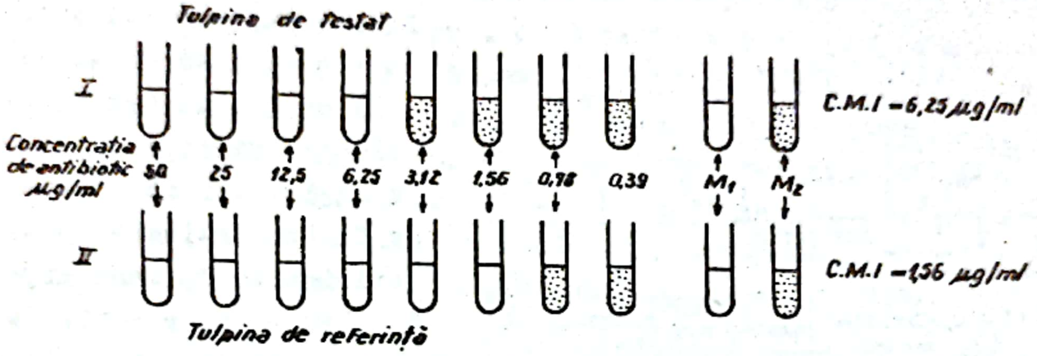


Fig. 43 Determinarea C.M.I. de antibiotic prin metoda diluțiilor.

In paralel, în aceleași condiții, se testează tulpina de referință față de CMI cunoscut.

Tuburile se incubează la 37°C, timp de 18-20 ore.

Citirea și interpretarea rezultatelor. Citirea ATB se face observînd tuburile fără creștere evidentă (mediu limpede) comparativ cu tubul martor, M_2(mediu tulbure). Adăugarea la mediul de cultură a unui indicator de pH (roșu fenol) permite aprecierea mai rapidă a dezvoltării sau lipsei de dezvoltare a culturii microbiene (virarea sau absența virării indicatorului).

CMI este reprezentat de concentrația de antibiotic din ultimult tub care a inhibat dezvoltarea bacteriei. In exemplul din fig. 43, CMI a tulpinii de testat = 6,25 µg/ml.

Gradul de sensibilitate al bacteriei infectante este stabilit prin raportarea CMI la nivelul seric mediu de antibiotic obținut după administrarea de doze uzuale.

In unele cazuri este indicată terapia cu asociații de antibiotice (de ex. în infecții mixte cauzate de bacterii cu sensibilitate diferită la antibiotice, pentru întărirea efectului bactericid într-o infecție monomicrobiană severă: endocardita cu enterococ, septicemia cu piocianic etc.). In general se cunoaște că an-

tibioticele bactericide care acţionează prin mecanisme diferite se potenţează reciproc prin asociere, de ex. penicilina G + streptomicina acţionează sinergic asupra enterococului. Cînd efectul asocierii de antibiotice nu este cunoscut, el va fi verificat prin testare „in vitro" faţă de tulpina infectantă.

Pentru studiul efectului inhibitor al asociaţiei de antibiotice se poate recurge la metoda dublei difuzii în geloză.

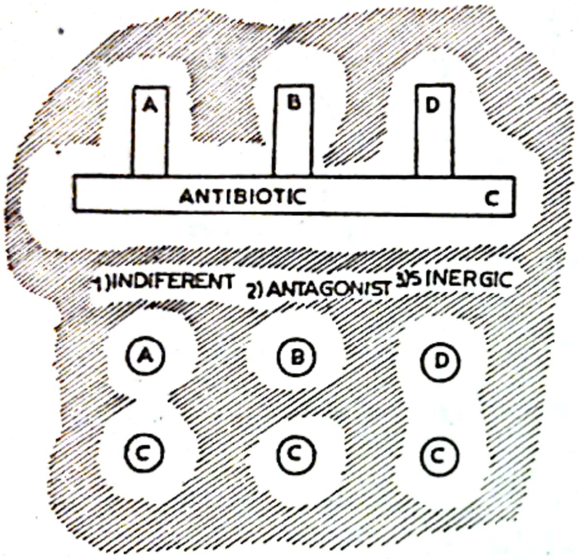


Fig.44 TESTAREA EFECTULUI INHIBITOR AL ASOCIATIEI DE ANTIBIOTICE

Intr-o cutie Petri cu agar nutritiv, însămînţat cu tulpina de testat (ca în metoda difuzimetrică), se plasează în mijloc o bandă de hîrtie de filtru îmbibată cu un antibiotic: C, iar perpendicular pe ea o serie de alte benzi de hîrtie de filtru impregnate cu diferite antibiotice: A, B, D (diluţiile de antibiotice vor fi corespunzătoare celor realizate în ser) (fig.44 sus). După incubare la 37°C, 18-24 ore, se citeşte rezultatul. Dacă zonele de inhibiţie a dezvoltării culturii, se întretaie în unghi drept, efectul este indiferent (1); dacă unghiul este ascuţit efectul este antagonist (2), iar dacă unghiul este rotunjit efectul este sinergic (3). Pentru simplificare se pot folosi, în locul benzilor de hîrtie de filtru îmbibate în antibiotice, discurile utilizate pentru antibiogramă, plasate la cca 10 mm unele de altele (fig.44 jos).

B. DETERMINAREA CONCENTRATIEI ANTIBIOTICELOR IN UMORI IN CURSUL ANTIBIOTICOTERAPIEI

Controlul eficienţei unui tratament cu antibiotice se poate face prin determinarea în umori a nivelului de eficienţă inhibitorie (NEI) şi/sau a nivelului de eficienţă bactericidă (NEB).

Prin NEI şi NEB se înţelege cea mai mare diluţie de ser care inhibă şi respectiv omoară 100-99,9% din bacteriile existente

Scanned with OKEN Scanner

în inoculum preparat din tulpina infectantă izolată de bolnav.

Determinarea NEI şi NEB este indicată în cazul unor infecţii bacteriene grave (septicemii, meningite, endocardite etc.), cînd medicul trebuie să se asigure rapid că antibioticul administrat realizează concentraţii active la nivelul focarului infecţios. Cercetarea nivelului de antibiotice în umori x) este practică pentru stabilirea dozelor şi intervalelor optime de administrare a unui antibiotic nou sau pe o cale nouă, cît şi pentru a controla dacă nivelul nu a depăşit pragul toxic (de ex. pericolul supradozării gentamicinii la bolnavii cu insuficienţă renală).

Practic, determinarea nivelurilor antimicrobiene se poate realiza prin metoda diluţiilor în mediu lichid pentru produsele normal sterile (sînge, l.c.r.) şi prin metoda difuzimetrică pentru produsele contaminate (urină, spută).

Determinarea NEI în ser prin metoda diluţiilor

Principiul metodei constă în stabilirea concentraţiei minime de antibiotic din serul bolnavului capabilă să producă inhibarea dezvoltării bacteriei infectante (metoda directă).

Material necesar:

- ser de cercetat obţinut din 10 ml sînge proaspăt recoltat;
- mediu de cultură lichid (MH cu indicator roşu fenol);
- cultură microbiană de 18 ore în mediu lichid a bacteriei infectante.

Tehnica: într-o serie de eprubete de 12 mm Ø, sterile, se fac diluţii duble de ser (1/2, 1/4, 1/8, ...) în mediu de cultură. In fiecare tub se adaugă cîte 0,05 ml din cultura microbiană diluată 1/1000 (tabel V).

In reacţie se folosesc următorii martori (M):

- M_1 pentru controlul sterilităţii serului (ser + mediu de cultură);

---

x) Pentru determinarea nivelului sangvin maxim, recoltarea sîngelui se face la 5-10 minute de la administrarea intravenoasă a antibioticului, la 1/2-3/4 de oră după administrarea intramusculară şi, în funcţie de antibiotic, la 1-3 ore după administrarea orală.

Pentru cercetarea nivelului minim, recoltarea se face imediat înainte de o nouă administrare de antibiotic.

Cunoscînd nivelul maxim, nivelul minim şi intervalul dintre aceste 2 determinări se poate deduce conduita tratamentului.

TABEL V DETERMINAREA N.E.I. PRIN METODA DIRECTĂ

Tuburi	1	2	3	4	5	6	7	8	M_1	M_2	M_3
Mediul de cultură ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ser de cercetat ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1
Diluţie de ser	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256			
Cultură din tulpină microbiană izolată de la bolnav dil 1/1000	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05		–	0,05	–
Cultură dintr-o tulpină microbiană rezistentă la antibioticul testat.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,05
Dezvoltarea culturii microbiene.	–	–	–	+	+	+	+	+	–	+	+

- M_2, pentru controlul dezvoltării tulpinii microbiene (mediu însămînţat);

- M_3, pentru controlul efectului antibacterian al serului (ser de cercetat diluat 1/2, însămînţat cu o tulpină microbiană rezistentă la antibioticul testat).

Tuburile se incubează la 37°C timp de 18-20 ore.

Citirea şi interpretarea reacţiei. Se notează tuburile fără creştere evidentă (mediu limpede sau absenţa virajului indicatorului) comparativ cu M_2.

Ultimul tub fără cultivare evidentă reprezintă diluţia cea mai mare de ser care a inhibat dezvoltarea bacteriei şi indică în mod direct NEI al antibioticului din ser faţă de bacteria infectantă. Pentru ca terapia să fie eficace, serul de bolnav trebuie să împiedice dezvoltarea bacteriei izolate în diluţie de cel puţin 1/8. NEI = inversul diluţiei ultimului tub care a inhibat dezvoltarea bacteriei; se exprimă în µg/ml. In exemplul prezentat în tabelul V, NEI = 8 µg/ml.

Pentru determinarea NEB, se fac treceri din eprubetele cu diluţii de ser fără creştere evidentă pe medii de cultură solide,

lipsite de antibiotic şi după 24 ore de incubare se efectuează numărătoarea coloniilor care s-au dezvoltat. Placa Petri pe care s-a observat un număr de colonii corespunzător unui număr de UFC x) ≤ 0,1% din inoculum iniţial corespunde diluţiei de ser cu efect bactericid.

Datele furnizate de antibiogramă, cît şi cele obţinute prin determinarea nivelurilor antimicrobiene, constituie un indicator preţios în orientarea corectă a antibioticoterapiei. Medicul clinician va trebui însă să ţină seama de faptul că aceste rezultate se referă la o probă efectuată „in vitro" şi necesită interpretare în funcţie de cazul clinic concret (relaţie „in vivo" micro-macroorganism).

---

x) Unitate formatoare de colonii

VIII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR IN INFECTIILE CAUZATE DE COCI GRAM-POZITIVI ASEZATI IN GRAMEZI

Cocii gram-pozitivi dispuşi în grămezi, în special implicaţi în infecţii la om, sînt încadraţi în genurile: Staphylococcus şi Peptococcus x).

Genul Staphylococcus (denumire de la gr.staphylos = ciorchine de strugure) include numeroase specii facultativ anaerobe, cu habitat pe tegumentele şi mucoasele omului şi/sau animalelor, avînd un potenţial de patogenitate variabil. Stafilococii pot contamina mediul extern (aer, suprafeţe, alimente), precum şi diferite produse patologice, de aceea în practica diagnosticului de laborator este necesară diferenţierea stafilococilor contaminanţi de cei cu semnificaţie clinică.

Din punct de vedere al patogenităţii pentru om, cea mai importantă specie este S.aureus, constituient al microbiotei indigene a mucoasei nasale şi intestinului la 20-30% din persoanele normale xx); din rezervorul nasal şi intestinal, S.aureus este însămînţat pe tegument unde prezenţa sa este tranzitorie. Bacterie condiţionat patogenă, S.aureus poate cauza infecţii cu localizări extrem de variate: se poate spune că orice ţesut sau organ poate fi sediul unei infecţii stafilococice.

Cele mai frecvente sînt infecţiile tegumentului şi ţesutului celular subcutanat: foliculite, abcese, furuncule, sicozis, acnee juvenilă, impetigo, flegmoane, pemfigus neonatorum, hidrosadenite, supuraţii ale plăgilor traumatice, chirurgicale sau arsurilor etc.; la nivelul fanerelor poate cauza panariţii. Necroza

---

x) Genul Peptococcus cuprinde specii strict anaerobe (vezi cap.XVI)

xx) In mediul de spital procentul purtătorilor nasali poate creşte la 40-70%.

epidermului şi dermului, precum şi a leucocitelor duce la formarea puroiului de culoare gălbuie şi aspect cremos.

Mai rar, poate determina:

- infecţii la nivelul mucoasei tractusului respirator superior şi de vecinătate: angine, otite, sinusite, mastoidite, parotidite;

- infecţii ale tractusului respirator inferior: pneumonii, bronhopneumonii;

- infecţii ale tractusului urinar: cistite, pielite, pielonefrite;

- infecţii uterine postpartum sau postabortum;

- la nivelul aparatului digestiv 2 tipuri de manifestări clinice cu mecanism de producere diferit: toxiinfecţii alimentare, prin consum de alimente în care s-a multiplicat o tulpină de S.aureus producătoare de enterotoxină, şi enterocolita stafilococică postantibiotică, prin selecţia la nivelul mucoasei intestinale, după un tratament prelungit cu antibiotice, a unei tulpini de S.aureus antibioticorezistentă şi producătoare de enterotoxină B.

Dintr-o infecţie localizată, stafilococul poate ajunge în circulaţia sangvină dînd bacteriemii, septicemii şi septicopiemii, cu localizări secundare:

- la nivelul seroaselor (meningite, artrite, pleurezii, peritonite);

- la nivelul ţesutului osos (osteite şi osteomielite);

- la nivelul organelor interne (abcese pulmonare, hepatice, renale, cerebrale, endocardite).

O entitate clinică de interes pentru medicul stomatolog este stafilococia malignă a feţei, infecţie septicemică cu punct de plecare de la un furuncul localizat la nivelul aripii nasului, endonasal sau buza superioară (zonă bogat vascularizată).

S.aureus este unul din principalii agenţi cauzali ai infecţiilor nosocomiale.

Alte specii de stafilococ cu habitat major la nivelul tegumentului uman: S.epidermidis, S.haemolyticus, S.hominis, S.warneri, S.saprophyticus etc., se comportă ca accidental patogeni putînd cauza endocardite, infecţii urinare, meningite, endoftalmite, infecţii ale plăgilor etc.

Scanned with OKEN Scanner

In infecţii de etiologie stafilococică, diagnosticul de laborator este numai bacteriologic.

Diagnostic bacteriologic

Localizarea extrem de variată a infecţiilor stafilococice explică diversitatea produselor patologice supuse examenului bacteriologic: puroi din colecţii închise sau fistulizate, exsudat faringian şi nasal, sînge, urină, l.c.r., spută, materii fecale etc.

a. Examenul microscopic reprezintă prima etapă, cu valoare diagnostică diferită în funcţie de produsul patologic examinat.

i. Pentru produse provenite din zone normal sterile (puroi din colecţii închise, l.c.r.), evidenţierea în frotiu a unor coci sferici de aproximativ 0,8-1 µm Ø, gram-pozitivi, dispuşi izolat, în diplo şi caracteristic în grămezi (fig.45) orientează diagnosticul spre o infecţie cu S.aureus (stafilococii accidental patogeni nu pot depăşi, în mod natural, barierele externe de apărare ale organismului). In meningite, rezultatul examenului microscopic este de mare valoare deoarece permite instituirea terapiei de urgenţă cu un antibiotic de rezervă la care S.aureus este natural sensibil (pînă la obţinerea rezultatelor antibiogramei).

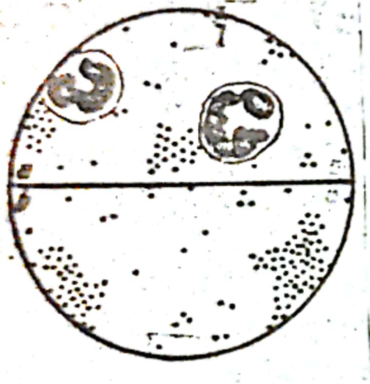


Fig.45 S.aureus
a. frotiu din produs
b. frotiu din cultură

ii. Pentru produse contaminate (puroi din plăgi, spută, urină, materii fecale), implicarea etiologică a unei tulpini de stafilococ se va face numai în baza criteriului cantitativ: predominanţa numerică la examenul microscopic a cocilor gram-pozitivi în grămezi. In plus, aspectul microscopic trebuie corelat cu examenul prin însămînţarea produsului.

b. Izolarea stafilococului prin însămînţarea produselor patologice pe medii de cultură urmăreşte evidenţierea posibilă a bacteriei în produse cu examen microscopic negativ sau identificarea ca specie a cocilor gram-pozitivi prezenţi la examenul microscopic direct. Ea se realizează pe medii simple sau compuse, incubate aerob la 37°C, timp de 18-24 ore.

i. Hemocultura reprezintă modalitatea de evidenţiere a sta-

filocoocului în sînge, în caz de bacteriemii sau septicemii. Se poate efectua pe medii simple, dar în mod obişnuit se utilizează medii compuse: bulion infuzie cord-creier glucozat 2‰; urmărirea hemoculturilor se face timp de 7-10 zile, macroscopic, microscopic şi prin treceri pe agar-sînge.

Din hemocultură se poate izola, ca agent etiologic, S.aureus şi mult mai rar alte specii: S.epidermidis, S.haemolyticus, S.hominis etc. Un aspect de care trebuie să se ţină seama este faptul că S.aureus şi mai ales celelalte specii, bacterii ubicvitare, pot interveni şi ca contaminanţi ai hemoculturii. Din acest motiv, implicarea ca infectant a tulpinii izolate cere în plus un criteriu de siguranţă: izolarea aceleiaşi tulpini, în mod repetat, din hemoculturile bolnavului investigat.

ii. Din produse normal sterile, cu examen microscopic pozitiv, însămînţarea pe agar-sînge permite confirmarea prin cultură a diagnosticului de infecţie cu S.aureus şi efectuarea antibiogramei.

iii. Pentru produse contaminate, însămînţarea în scop de diagnostic se face semicantitativ sau cantitativ. Izolarea S.aureus, bacterie condiţionat patogenă, va fi corelată cu starea clinică numai atunci cînd această specie corespunde florei dominante din produsul respectiv. Exemple:

. diagnosticul de infecţie urinară stafilococică se stabileşte prin urocultură cantitativă, în condiţiile în care numărul microbilor depăşeşte 5.10^4 UFC/ml urină;

. în enterocolita stafilococică postantibiotică însămînţarea semicantitativă a materiilor fecale va demonstra predominanţa S.aureus, rezistent la antibioticul cu care a fost tratat bolnavul, în raport cu bacilii gram-negativi care formează flora microbiană normală a colonului; acest aspect poate fi sesizat prin examenul microscopic al materiilor fecale.

iv. In caz de toxiinfecţii alimentare, izolarea stafilococului enterotoxic din materii fecale, produs patologic intens contaminat, se realizează prin însămînţare pe medii selective hiperclorurate (conţin 15% ClNa) cu manită - mediul Chapmann solid.

c. Identificarea speciei de Staphylococcus se realizează prin:

- aspectul coloniilor: pe medii solide S.aureus cultivă sub formă de colonii S, mari (2 mm Ø), opace, de consistenţă cremoasă,

cel mai frecvent pigmentate în oranj. Celelalte specii de stafilococ dezvoltă colonii de obicei cu pigment alb sau galben;

- prezența unei zone clare de liză în jurul coloniilor pe agar-sînge: S.aureus este cel mai frecvent hemolitic dar şi unele tulpini de S.epidermidis şi S.haemolyticus pot da testul pozitiv;

- testul coagulazei: numai tulpinile de S.aureus sînt prin definiție coagulazo-pozitive[x)]. Testul se practică de obicei în tub şi constă în însămînțarea unei anse din cultura de 18-20 ore pe agar nutritiv a tulpinii de cercetat în 0,5 ml plasmă citratată de iepure (2 ml sol. 5% citrat de sodiu + 8 ml sînge), diluată 1:4 în soluție salină izotonă; incubare la 37°C în baia de apă. Testul este considerat pozitiv cînd se observă coagularea plasmei în interval de 1-18 ore. Citirea reacției se face comparativ cu 2 martori: pozitiv (tulpină de stafilococ sigur pozitivă + plasmă diluată) şi negativ (soluție salină izotonă + plasmă diluată);

- fermentarea manitei: testul practicat în anaerobioză este util pentru identificarea numărului redus de tulpini de S.aureus coagulazo-negative şi diferențierea acestora de ceilalți stafilococi coagulazo-negativi[xx)].

Identificarea enterotoxinei produsă de unele tulpini de S.aureus, cauzatoare de toxiinfecții alimentare, se face prin testul de imunodublădifuzie în gel de agar (vezi cap.V).

In infecții cu caracter epidemic, cum sînt infecțiile de spital, este necesară depistarea sursei de infecție. In acest scop se vor recolta probe de puroi de la bolnavi, tampoane nasale de la personalul medical şi de îngrijire din serviciul respectiv, cît şi probe de mediu (aer, suprafețe etc.). Tulpinile de S.aureus izolate, coagulazo-pozitive, vor fi supuse identificării prin tipare fagică[xxx)] (vezi pag.63). Evidențierea aceluiaşi lizotip agresiv

---

x) 97% din tulpinile de S.aureus elaborează coagulază, de aceea evidențierea acestei enzime constituie cel mai important test de identificare

xx) Numai S.aureus fermentează manita în anaerobioză

xxx) Lizotiparea este de competența laboratoarelor de profil; în laboratorul clinic, identitatea tulpinilor de stafilococ izolate poate fi apreciată prin spectrul identic de sensibilitate al acestora în condițiile efectuării antibiogramei difuzimetrice față de un număr cît mai mare de antibiotice

la tulpinile de S.aureus izolate de la bolnavi şi de la purtător (i) confirmă diagnosticul de izbucnire epidemică şi stabileşte sursa de infecţie.

d. Sensibilitatea la antibiotice. S.aureus ca specie este sensibil la o gamă largă de antibiotice, inclusiv la penicilină G. Ca urmare însă a folosirii îndelungate a penicilinei G în terapia de rutină a infecţiilor de spital, s-au selectat numeroase tulpini rezistente la acest antibiotic [x)] prin producerea de penicilinază. De aceea testarea sensibilităţii la antibiotice prin antibiogramă este obligatorie iar în caz de tulpini rezistente la penicilina G se va utiliza în terapie o penicilină de semisinteză rezistentă la penicilinaza stafilococică (ex. oxacilina) sau un alt antibiotic la care tulpina se dovedeşte sensibilă: eritromicină, lincomicină, pristinamicină, vancomicină etc.

Deoarece există tulpini de S.aureus tolerante la penicilină (CMB mai mare de sute de ori decît CMI), în infecţii severe (ex. septicemii, endocardite), pentru a realiza concentraţii bactericide de antibiotic în sînge, este necesară determinarea CMB a penicilinei pentru tulpina izolată.

[x)] Proporţia de rezistenţă poate atinge valori de 80-90%

IX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR IN INFECTIILE CAUZATE DE COCI GRAM-POZITIVI AŞEZAŢI IN LANŢURI

Cocii gram-pozitivi dispuşi în lanţuri, implicaţi în infecţii la om, sînt încadraţi în genurile Streptococcus şi Peptostreptococcus x).

Genul Streptococcus (denumire de la gr.streptos=lanţ) include numeroase specii, majoritatea facultativ anaerobe iar unele microaerofile, cu habitat uman şi/sau animal.

Din punct de vedere a patogenităţii pentru om, streptococii pot fi patogeni, condiţionat patogeni şi accidental patogeni.

Str.pyogenes (grup A Lancefield xx)), specie înalt patogenă cu habitat uman în nasofaringe la 10-20% din persoanele normale, poate cauza infecţii acute cu localizare la nivelul tractusului respirator superior: faringite, angine, scarlatină xxx), tegumentului: piodermite, erizipel, infecţii ale plăgilor, cu posibile complicaţii precoce supurative: otite, sinuzite, limfadenite, pneumonii, septicemii, meningite, endocardite acute etc., sau complicaţii tardive nesupurative: febra reumatismală şi glomerulonefrita.

Infecţii asemănătoare celor cauzate de Str.pyogenes, dar cu evoluţie mai benignă, pot fi determinate de streptococii grup C şi G cu habitat animal şi uman în nasofaringe şi pe tegument.

Str.agalactiae (grup B Lancefield), specie condiţionat patogenă, poate fi prezent ocazional la unele persoane normale pe mu-

---

x) Genul Peptostreptococcus include specii strict anaerobe (vezi cap.XVI)

xx) Pe baza antigenului polizaharidic C de perete, streptococii au fost clasificaţi în 19 grupuri serologice notate de la A la H şi de la K la T

xxx) Primoinfecţie streptococică a copilăriei, caracterizată prin angină şi exantem, în patogenia căreia intervine eritrotoxina.

coasa oro-faringiană, vaginală sau în intestin. Determină infecţii grave (septicemii, meningite) în special la nou născuţi.

Enterococii (streptococi grup D Lancefield) cu habitat normal în intestinul omului şi animalelor pot contamina mucoasa vaginală şi uretra iar prin „mîini murdare" ajung pe mucoasa bucală şi în alimente. Specii condiţionat patogene, enterococii pot cauza infecţii ale căilor urinare şi endocardite subacute.

Streptococii viridans (orali), bacterii accidental patogene, sînt constituienţi ai microbiotei indigene a cavităţii bucale. Reprezintă una din cauzele majore ale endocarditei subacute iar unele specii sînt implicate în producerea cariei dentare.

Str.pneumoniae, prezent pe mucoasa tractusului respirator superior la 30-70% din persoanele normale, este un condiţionat patogen care determină frecvent pneumonii, bronhopneumonii, otite, sinuzite, meningite.

A. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ANGINEI STREPTOCOCICE

Angina streptococică reprezintă cea mai frecventă manifestare clinică cauzată de Str.pyogenes (streptococ beta-hemolitic grup serologic A). Infecţii asemănătoare pot fi cauzate, mai rar, de streptococii grup C şi G.

1. Diagnostic bacteriologic

Examinarea clinică a faringelui nu este capabilă să precizeze cu certitudine etiologia streptococică a unei angine. Se impune, deci, efectuarea unui examen bacteriologic înainte de administrarea unei antibioticoterapii.

a. Recoltarea produsului patologic, reprezentat de exsudatul faringian, va fi realizată cu ajutorul unui tampon steril din vată hidrofilă ce va fi trimis apoi la laborator, într-un interval de timp cît mai scurt. Dacă se depăşesc 2 ore, se impune utilizarea unui mediu de îmbogăţire şi transport - bulion Pike (bulion cu cristal violet şi azid de sodiu, livrat de I.C.Bucureşti, la care se adaugă în momentul utilizării sînge defibrinat de berbec 5%); mediul este repartizat în tuburi sterile, în volum de 2 ml, în care se introduce tamponul cu exsudat faringian. Se apreciază că în aceste condiţii streptococii beta-hemolitici pot rezista la temperatura mediului ambiant 3 zile.

b. Examenul microscopic al frotiului colorat Gram din tampo-

nul faringian are valoare diagnostică orientativă atunci cînd evidențiază prezența de coci sferici, de aproximativ 1 um, gram-pozitivi, în lanțuri, asociați cu polimorfonucleare. Totodată el permite eliminarea anginelor de altă etiologie (fuso-spirochetică, difterică etc.).

c. Izolarea pe medii de cultură. Produsul este descărcat de pe tampon pe un sector din suprafața unei plăci Petri cu agar-sînge; inoculum este apoi dispersat cu ansa pentru a obține colonii izolate. Plăcile sînt incubate la temperatura de 37°C, timp de 18-24 ore, de preferat în atmosferă de 5% CO_2.

Coloniile de streptococi beta-hemolitici grup A sînt mici, de aproximativ 1 mm Ø, translucide și pot fi reperate ușor prin zona largă de hemoliză clară, beta-hemoliză, care le înconjoară datorită producerii streptolizinei S (oxigen-stabilă). Deoarece există tulpini care nu elaborează această enzimă, formînd în culturi aerobe colonii alfa-hemolitice, însămînțarea produsului în „dublu-strat" x) mărește procentul izolărilor de streptococi hemolitici grup A care nu produc streptolizină S.

Streptococii aparținînd grupurilor serologice C și G pot da colonii asemănătoare.

d. Identificarea streptococilor beta-hemolitici grup A. Caracterele microscopice, coci gram-pozitivi dispuși în lanțuri (fig.46) și de cultură nu permit diferențierea Str.pyogenes de alți streptococi beta-hemolitici. Apartenența la grupul serologic A al tulpinii izolate se stabilește prin:

i. testul orientativ cu bacitracină: 1-2 colonii beta-hemolitice din primocultură sînt repicate cu ansa și însămînțate în striuri dense paralel pe un sector al plăcii cu agar-sînge iar în centru se depune un microcomprimat ce conține 0,25

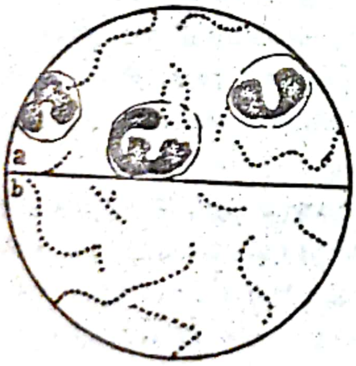


Fig.46 Str.pyogenes
a. frotiu din produs
b. frotiu din cultură

x) Intr-o placă Petri, cu diametrul de aproximativ 10-12 cm, se toarnă 10 ml agar, în prealabil topit și răcit la 45°C, la care s-a adăugat sînge. După solidificare, se însămînțează produsul la suprafața mediului și apoi inoculum se acoperă cu un al doilea strat din același mediu

micrograme bacitracină. Obţinerea, după 18-20 ore de incubare la 37°C, a unei zone de inhibare a culturii ≥10 mm Ø permite identificarea prezumtivă x) a tulpinii ca Str.pyogenes. Absenţa zonei de inhibare indică apartenenţa la alte grupuri serologice. Situaţii intermediare impun repetarea testului sau determinarea grupului prin metode serologice;

ii. identificarea serologică de grup, care se bazează pe existenţa unei componente antigenice de perete, de natură polizaharidică, substanţa C. Ea se poate realiza prin metode de precipitare (reacţia de precipitare în inel, în special), în care caz reacţia are loc între polizaharidul specific de grup, extras prin diferite metode (cu HCl N/5 la cald, cu pronază B etc.) şi serurile imune specifice antigrup.

Mai recent a fost pusă la punct reacţia de coaglutinare care permite identificarea rapidă a streptococilor. La noi în ţară I.C.Bucureşti livrează o trusă de reactivi „Streptic" ce conţine proteina A a tulpinii Cowan I de S.aureus cuplată cu ser antistreptococic corespunzător grupurilor A,B,C şi respectiv G.

Tehnica: pe o lamă de sticlă se pun 4 picături din sedimentul culturii de identificat (cultură de 24 ore în bulion glucozat 2 ‰ cu adaos de extract pancreatic pentru creştere omogenă) la care se adaugă cîte o ansă (4 mm Ø) din fiecare reactiv de grup: A,B,C şi G. După omogenizare cu ansa şi repetate mişcări de înclinare a lamei se urmăreşte apariţia aglutinării, care este vizibilă macroscopic, în interval de 1-2 minute, în picătura cu reactiv de grup corespunzător tulpinii testate.

In cadrul grupului A există numeroase serotipuri care pot fi identificate printr-o reacţie de precipitare în inel (identificarea antigenului proteic M) sau printr-o reacţie de aglutinare pe lamă (identificarea antigenului proteic T). Stabilirea serotipului are importanţă epidemiologică şi este de competenţa laboratoarelor de referinţă.

e. Sensibilitatea la antibiotice. Streptococii beta-hemolitici grup A fac parte dintre puţinele bacterii care şi-au păstrat

---

x) Streptococii de grup A sînt sensibili la bacitracină în proporţie de 98,5% iar cei aparţinînd altor grupuri serologice sînt rezistenţi în proporţie de 97,5%.

nemodificată marea sensibilitate naturală la penicilina G (CMI în medie egală cu 0,02 UI/ml, cu variații cuprinse între 0,002-0,05 UI/ml). In consecință, terapia se face de elecție cu acest antibiotic fără a fi necesară antibiograma. Dacă bolnavul este sensibilizat la penicilină se recomandă administrarea de eritromicină, dar pe bază de antibiogramă.

2. Diagnostic serologic

Examenul serologic este utilizat în diagnosticul bolilor poststreptococice: reumatismul articular acut și glomerulonefrita acută. In serul persoanelor care au avut o infecție streptococică apar o serie de anticorpi corespunzători diferitelor exoenzime streptococice: antistreptolizină O, antihialuronidază, antistreptokinază, antidezoxiribonuclează B etc., precum și anticorpi față de componenta endocelulară MAP (anti-MAP).

Cel mai frecvent se recurge la dozarea antistreptolizinei O, reacția ASLO. Testul se bazează pe neutralizarea „in vitro" a efectului hemolitic al streptolizinei O (SLO) de către anticorpii corespunzători din serul de cercetat.

Elementele reacției:

- ser de bolnav inactivat și tratat cu o soluție de rivanol 0,4% pentru îndepărtarea inhibitorilor nespecifici [x];
- SLO liofilizată și activată (preparată de I.C.București), rehidratată în momentul utilizării; se folosește o doză standard (1 unitate combinantă);
- suspensie de hematii de iepure 5%.

Redăm mai jos, schematizat, micrometoda de dozare în plăci cu godeuri (fig.47).

Citirea reacției: neutralizarea SLO prin antistreptolizină O se traduce prin lipsa hemolizei iar absența neutralizării prin hemoliză. Titrul serului exprimat în unități (U) ASLO/ml este dat de ultimul tub al reacției în care hemoliza lipsește (în exemplul din fig.47, titrul serului este de 640 U/ml). Titrurile ASLO semnificative pentru diagnostic sînt considerate cele >200 U ASLO/ml. Reacția se efectuează în dinamică.

---

[x] Inhibitorii nespecifici ai reacției ASLO sînt situați în fracțiunile alfa- și beta-lipoproteinelor.

Soluţie NaCl 0,9%o(ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ser de cercetat (ml) (dil.)	0,2 1/40	0,2 1/50	0,2 1/40	0,2 1/50	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Streptolizină 0 (ml) (1 unitate combinantă)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
15 minute la 37° C											0,2 ml	0,2 ml
Suspensie de hematii 5% (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
45 minute la 37° C												
Incubare peste noapte la +4° C												
Unităţi ASLO / ml	40	50	80	100	160	200	320	400	640	800	1280	1600
Aspectul reacţiei												

lipsa hemolizei — hemoliză

Fig.47 Tehnica reacţiei ASLO

Deoarece numai aproximativ 80% din persoanele cu reumatism articular acut au titrul ASLO > 200 U/ml, procentul rezultatelor pozitive poate fi mărit prin investigarea şi a altor anticorpi: antihialuronidază, antidezoxiribonuclează B, antistreptokinază, anti-MAP etc.

Mai recent a fost introdus „Streptozyme Test". Acesta se bazează pe o reacţie de hemaglutinare în care hematiile sînt învelite cu un amestec de exoenzime (streptolizină O, dezoxiribonuclează B, streptokinază şi hialuronidază), ceea ce permite decelarea simultană a unui număr mai mare de anticorpi antistreptococici.

3. <u>Dozarea complementului seric</u>

In glomerulonefrita acută poststreptococică, formarea complexelor antigen-anticorp are loc cu fixarea C seric, ceea ce duce la scăderea valorilor normale a acestuia.

Metodele de dozare urmăresc evaluarea activităţii hemolitice a C seric exprimată în unităţi CH_{50}/ml. Constantele normale variază în raport cu metodele folosite. In tehnica propusă de M.Duca şi colaboratorii, valorile normale sînt cuprinse între 800-1600 CH_{50}/ml, în glomerulonefritele poststreptococice înregistrîndu-se valori între 150-600 CH_{50}/ml.

Scanned with OKEN Scanner

B. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ENDOCARDITEI SUBACUTE STREPTOCOCICE

Endocardita subacută este o entitate clinică caracterizată printr-o evoluţie lentă, totdeauna letală în absenţa tratamentului adecvat cu antibiotice; ea apare consecutiv grefării pe valvulele cardiace lezate (leziuni de cardită reumatismală, proteze valvulare, malformaţii congenitale etc.) a unor bacterii condiţionat sau accidental patogene.

Aproximativ 70% din endocarditele subacute sînt cauzate de streptococi bucali (viridans), cel mai frecvent implicat fiind Str. sanguis, urmat de Str.mutans şi Str.mitior (tabelul VI). De asemenea

Tabel VI. UNELE CARACTERE DE DIFERENTIERE ALE STREPTOCOCILOR BUCALI

Specia	Grupul serologic	Tipul de hemoliză	Formarea de PE x)		Fermentarea unor zaharuri				Hidroliza	
			Fructan	Glucan	Inulină	Lactoză	Sorbitol	Manitol	Esculină	Arginină
Str. sanguis	H	α,γ,β	−	V	V	+	−	−	V	+
Str. mutans	Unele tulpini E	α,γ	−	+	+	+	+	+	+	−
Str. mitior	Unele tulpini HO sau K	α	−	V	V	V	−	−	−	−
Str. salivarius	Unele tulpini K	γ,α,β	+	−	V	+	−	−	+	−
Str. milleri	Majoritatea tulp. F	γ,β,α	−	−	+	V	−	−	V	V

x) Polizaharizi extracelulari evidentiaţi prin însămînţarea tulpinii pe geloză sau în bulion cu zaharoză 5 %

V= Comportare variabilă a tulpinilor

nea pot interveni, cu o frecvenţă deloc neglijabilă, enterococii: Str.faecalis şi Str.faecium, streptococi aparţinînd grupului serologic D.

Diagnostic bacteriologic

a. Diagnosticul etiologic al endocarditei subacute se stabi-

lește prin efectuarea a 3 hemoculturi în interval de 24 ore, anterior începerii tratamentului cu antibiotice.

Aproximativ 10 ml sînge obținut prin puncție venoasă, în condiții riguros aseptice, se însămînțează în bulion infuzie cord-creier glucozat 2‰, folosind de preferință tehnica hemoculturii pe cheag de fibrină. Metoda constă în însămînțarea sîngelui, în cantități fracționate (0,5-1,5 ml), într-o serie de eprubete cu mediu de cultură, repartizat în coloană înaltă (cîte 15 ml), prin prelingerea acestuia pe peretele uscat al tuburilor; după însămînțare, eprubetele sînt menținute în repaus aproximativ 30 minute pentru formarea tramei de fibrină pe toată înălțimea coloanei de mediu. Incubarea hemoculturilor se face la 37°C.

b. <u>Pozitivarea hemoculturilor</u> se verifică după 24 ore și eventual pînă la 10 zile:

- macroscopic: hemocultura pozitivă se traduce prin apariția pe cheagul de fibrină a unor colonii bine vizibile cu ochiul liber;

- microscopic: frotiul colorat Gram va evidenția coci grampozitivi în lanțuri;

- prin treceri pe agar-sînge: colonii S, mici (cca 1 mm Ø), alfa-hemolitice (înconjurate de o zonă de înverzire a mediului), nehemolitice (gama-hemolitice) sau mult mai rar beta-hemolitice.

c. <u>Identificarea</u> serologică sau prin teste biochimice permite, într-o primă etapă, diferențierea streptococilor grup D de streptococii bucali;

- identificarea serologică se face printr-o reacție de precipitare în inel cu ser imun de grup D, utilizînd un extract antigenic preparat din tulpina izolată;

- cultivarea pe mediul cu 40% bilă, hidroliza esculinei cu formarea de colonii negre și dezvoltarea în medii cu 6,5% NaCl sînt caracteristice pentru enterococi.

Principalele specii de streptococi bucali pot fi diferențiate pe baza caracterelor incluse în tabelul VI.

d. <u>Sensibilitatea la antibiotice</u>. Majoritatea tulpinilor de streptococi viridans și-au păstrat sensibilitatea naturală la penicilina G; doza terapeutică va fi stabilită în raport cu nivelul de eficiență bactericidă a serului. In cazul unei tulpini rezistentă la penicilină se va utiliza asociația sinergică penicilină + streptomicină.

Enterococii sînt de obicei rezistenţi la penicilină iar multirezistenţa la antibiotice este şi ea frecventă. Ca medicaţie bactericidă se recomandă asociaţia penicilină + streptomicină (sau vancomicină + streptomicină în caz de sensibilizare la penicilină).

C. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL PNEUMONIEI PNEUMOCOCICE

Pneumonia lobară acută reprezintă cea mai frecventă entitate clinică cauzată de Str.pneumoniae. La sugari şi bătrîni, şi în general la persoanele cu mecanisme de apărare antiinfecţioasă, locale şi generale, alterate, infecţia poate îmbrăca un aspect deosebit de grav cu focare multiple. Uneori infecţia se poate propaga pe cale limfatică la pleură dînd pleurezii.

Dintre infecţiile extrapulmonare date de Str.pneumoniae menţionăm otite, sinusite, mastoidite, conjunctivite şi localizări secundare în cursul unor bacteriemii - meningite purulente (în special la copil), artrite, endocardite.

Diagnostic bacteriologic

Examenul bacteriologic reprezintă singura modalitate de diagnostic în infecţiile cauzate de Str.pneumoniae.

a. Recoltarea produselor patologice. In infecţiile tractusului respirator inferior se recurge, cel mai comod, la recoltarea sputei [x)], produs care se constituie în zonă normal sterilă dar se contaminează masiv cu flora oro-faringiană în momentul eliminării. Pentru a trimite la laborator un produs patologic reprezentativ, trebuie respectate indicaţiile de recoltare menţionate în cap.III.

De la copii şi adulţi care nu reuşesc să expectoreze se poate recurge la recoltarea exsudatului bronşic pe tampon laringian.

Deoarece infecţia pulmonară pneumococică se însoţeşte, în aproximativ 30% din cazuri, de bacteriemii, se recomandă efectuarea concomitentă de hemoculturi repetate, de preferat în bulion infuzie cord-creier glucozat 2‰, de mare valoare diagnostică.

b. Examenul microscopic al frotiurilor colorate Gram şi cu albastru de metilen, efectuate din fragmentele muco-purulente de spută, spălate succesiv în 3 băi cu soluţie cloruro-sodică izotonă sterilă (pentru diminuarea florei de contaminare din salivă) suge-

---

x) Cele mai fidele rezultate se obţin cu aspiratul bronşic recoltat prin puncţie transtraheală.

rează diagnosticul de infecție cu pneumococ în condițiile în care:

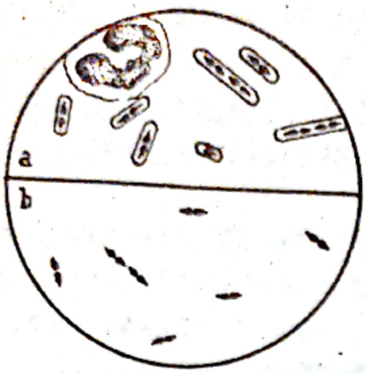


Fig.48 Str.pneumoniae
a. frotiu din produs
b. frotiu din cultură

- la microscopul cu imersie se evidențiază în număr predominant (> 10/cîmp), diplococi ovalari, de 0,5-1,25 µm, „în flacără de lumînare", gram-pozitivi, capsulați (fig.48, a);

- la microscopul cu mărire 100x sînt prezente un număr important de polimorfonucleare (> 25/cîmp) și un număr redus de celule epiteliale de descuamație(< 10/cîmp).

c. Izolarea din spută și identificarea Str.pneumoniae se poate realiza prin:

i. inocularea subcutanată la șoarecele alb, care permite o izolare rapidă a pneumococului și confirmarea virulenței sale: animalul face o infecție septicemică mortală, în interval de 24-72 ore, cu prezența de diplococi caracteristici în amprentele din splină și ficat colorate Gram. Hemocultura efectuată din cordul șoarecelui permite izolarea în cultură pură a pneumococului și practicarea antibiogramei (de reținut că unele tipuri serologice, de ex. serotipul 14, sînt avirulente pentru șoarece);

ii. însămînțarea semicantitativă pe agar-sînge (fig.49) care va fi incubată preferențial în atmosferă cu 5% CO_2. Predominanța numerică a coloniilor care se dezvoltă pînă în zonele 3 și 4 de dispersie, constituie criteriul de implicare etiologică.

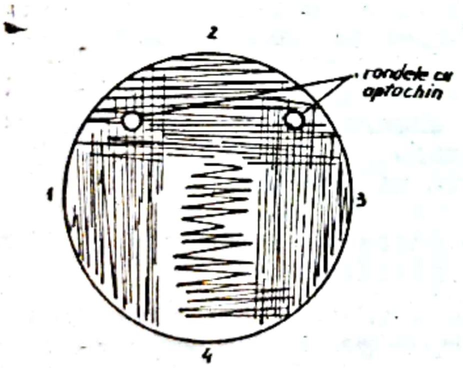


Fig.49 Sputocultura : modul în care se epuizează inoculum în însămînțarea semicantitativă.

Coloniile seamănă foarte mult macroscopic cu cele de streptococi alfa-hemolitici (viridans). De asemeni examenul microscopic pune în evidență coci ovalari în perechi sau scurte lanțuri (fig.48, b), aspect morfologic care poate fi reprodus și de streptococii viridans. Pentru diferențiere în primocultură se recomandă plasarea în sectoarele 1 și 2 de epuizare a unor discuri din hîrtie de filtru (6 mm Ø) care conțin 5 µm optochin (etilhidrocupreină), substanță față de care pneumococul se demonstrează sensi-

bil (zonă de inhibiţie a creşterii >20 mm).

Cînd dispunem de seruri imune specifice de specie şi de tip (sînt descrise 87 serotipuri de pneumococ pe baza antigenului polizaharidic capsular) se poate practica o identificare serologică, folosind testul de umflare a capsulei x) sau reacţia de coaglutinare xx).

Diagnosticul de infecţie pneumococică poate fi stabilit precoce şi rapid prin evidenţierea antigenului polizaharidic capsular solubil direct în produsul patologic (l.c.r., spută, urină, ser) folosind diferite teste imunologice: IEP-C, coaglutinare, ELISA etc. In acelaşi timp, această metodologie măreşte şansele de diagnostic în cazurile bacteriologic negative datorate autolizei germenilor.

d. Sensibilitatea la antibiotice. Pneumococii sînt în general sensibili la penicilina G care constituie antibioticul de elecţie în tratamentul infecţiilor pneumococice. In cazul unei tulpini rezistentă la penicilină se va utiliza un alt antibiotic: eritromicină, tetraciclină, cefalosporină sau cotrimoxazol (Biseptol) ales pe baza antibiogramei.

---

x) Din cultura de 18 ore în bulion Todd-Hewitt (bulion glucozat cu bicarbonat de sodiu şi fosfat disodic) a tulpinii de identificat se depune pe lamă o picătură care este pusă în contact cu o ansă din serul imun antipneumococic polivalent; se adaugă o picătură dintr-o soluţie apoasă 1% de albastru de metilen, după care preparatul se acoperă cu o lamelă şi se examinează la microscopul cu imersie. In cazul unui test pozitiv se observă pneumococi coloraţi în albastru, înconjuraţi de o capsulă mare, refringentă. Pentru stabilirea tipului de pneumococ, reacţia se practică în continuare cu seruri imune specifice de tip.

Reacţia de „umflare a capsulei" poate fi realizată şi direct în preparatul microscopic din produsul patologic

xx) Din supernatantul culturii de identificat de 18 ore în bulion Todd-Hewitt sau bulion-sînge se depun pe o lamă 2 picături: prima picătură este pusă în contact cu o ansă din serul coaglutinant polivalent iar a doua picătură cu o ansă din martorul reacţiei (suspensie de stafilococ Cowan I sensibilizată cu ser normal de iepure). După omogenizare, prin repetate mişcări de înclinare imprimate lamei, se urmăreşte apariţia aglutinării în picătura cu reactiv polivalent. In cazul unei reacţii pozitive, cîte o picătură din supernatantul culturii de identificat va fi pusă în contact cu reactivii monospecifici corespunzători tipurilor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 14 şi 19 mai frecvent întîlnite la noi în ţară

Scanned with OKEN Scanner

X. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE COCI GRAM-NEGATIVI

Cocii gram-negativi cu importanţă medicală pentru om fac parte din 2 familii: Neisseriaceae şi Veillonellaceae.

Familia Neisseriaceae include diplococi gram-negativi, imobili, nesporulaţi, cu feţele adiacente plane sau uşor concave (aspect de „boabă de cafea"), de 0,6-1 /um Ø, aerobi; unele specii posedă o capsulă sau o microcapsulă. Sînt grupaţi în patru genuri: Neisseria, Moraxella (cu subgenurile Moraxella şi Branhamella), Acinetobacter şi Kingella.

In raport cu caracterele de cultură şi de patogenitate, constituienţii genului Neisseria pot fi împărţiţi în 2 grupuri:

- N.meningitidis şi N.gonorrhoeae, specii patogene pentru care omul este singura gazdă naturală. Pretenţioase nutritiv, cultivă numai pe medii speciale îmbogăţite, la 36-37°C, creşterea fiind favorizată în atmosferă umedă cu 5% CO_2; şi
- N.sicca, N.subflava, N.flavescens, N.mucosa şi N.lactamica, cunoscute sub numele de „neisserii nepretenţioase", care fac parte din microbiota indigenă bucală, nasofaringiană, genito-urinară şi conjunctivală; unele specii sînt accidental patogene. Nepretenţioase nutritiv, cultivă pe medii uzuale la 22°C.

Branhamella catarrhalis, specie a genului Moraxella, este un comensal al nasofaringelui, cu caractere morfotinctoriale similare neisseriilor; a fost izolată din unele cazuri de meningită, otită, sinusită maxilară şi pneumonii.

Familia Veillonellaceae grupează coci cu morfologie asemănătoare neisseriilor, strict anaerobi, componenţi ai florei Veillon (vezi cap.XVI).

A. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL MENINGITEI MENINGOCOCICE

N.meningitidis (meningococul) este agentul cauzal al unei meningite purulente cu potențial epidemic.

Alte infecții determinate de N.meningitidis: rinofaringite, cel mai frecvent cu evoluție inaparentă, artrite, endocardite și erupții cutanate cu aspect peteșial în cadrul unei bacteriemii meningococice, mult mai rar uretrite, pneumonii.

Meningococul poate fi prezent în nasofaringe la purtători.

Diagnosticul de laborator al meningitei meningococice se bazează numai pe examen bacteriologic.

Diagnostic bacteriologic

a. Recoltarea și transportul produselor patologice. Lichidul cefalorafidian (l.c.r.) este recoltat riguros aseptic, în mod obișnuit prin puncție lombară, în 2 tuburi sterile de centrifugă, în volum de 4-6 ml. In momentul recoltării se fac aprecieri asupra aspectului macroscopic al l.c.r. care variază în funcție de importanța reacției celulare și de numărul germenilor: el poate fi opalescent sau purulent; în faza precoce a bolii, l.c.r. poate avea un aspect clar.

Viabilitatea meningococului fiind puternic afectată de factorii de mediu se impune prelucrarea cît mai rapidă a probei în laborator, pe toată durata transportului asigurîndu-se o temperatură ambiantă de 37°C (de ex. prin menținerea tuburilor cu l.c.r. într-un vas cu apă caldă sau într-o cutie izotermă).

Bacteriemia care însoțește meningita meningococică justifică efectuarea concomitentă a hemoculturii.

In epidemii, depistarea purtătorilor de germeni se realizează prin recoltarea exsudatului nasofaringian.

b. Examenul microscopic. Una din probele de l.c.r. recoltate se centrifughează 10-15 minute la 1000 xg iar din sediment se fac frotiuri colorate Gram și cu albastru de metilen x). Examenul bacterioscopic practicat imediat după prelevarea probei evită autoliza meningococilor.

x) Dacă l.c.r. este clar sau opalescent, pentru diferențierea meningitelor acute bacteriene de cele virale și de meningita tuberculoasă, din supernatantul probei se vor efectua examene biochimice: proteinorahia, a cărei valori sînt mult crescute peste limita normală, glicorahia care este scăzută și clorurorahia care este normală.

Prezența de frecvente polimorfonucleare și diplococi gram-negativi ovalari cu axul mare paralel și fețele adiacente aplatizate, intra- și extracelulari (fig.50) stabilește diagnosticul de meningită cu Neisseria, cel mai probabil N.meningitidis și permite instituirea terapiei pe baza cunoașterii spectrului său natural de sensibilitate la antibiotice.

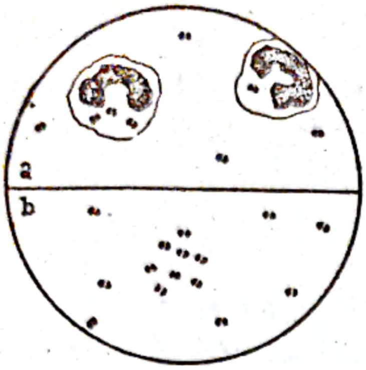


Fig.50 N.meningitidis
a. frotiu din l.c.r.
b. frotiu din cultură

Cînd există un număr suficient de bacterii pe cîmpul microscopic, se poate încerca o identificare serologică a meningococilor de grup A și C (unele tulpini prezintă o microcapsulă) prin testul de umflare a capsulei.

c. Izolarea se practică prin însămînțarea produselor patologice pe medii de cultură adecvate. Această etapă este obligatorie pentru diagnostic, mai ales în meningitele cu l.c.r. negativ la examenul microscopic; în același timp permite stabilirea cu certitudine a speciei de Neisseria infectantă.

Sedimentul probei de l.c.r. (primul tub) este însămînțat pe agar Mueller-Hinton, agar-șocolat x) sau agar-sînge, mediile fiind în prealabil încălzite la termostat; incubare în vas ermetic închis, în atmosferă umedă cu 5% CO_2, la 37°C, timp de 24-48 ore. Coloniile de N.meningitidis sînt de tip S, rotunde, strălucitoare, nepigmentate, translucide, de aproximativ 1 mm ø.

Din proba de l.c.r. necentrifugată (al doilea tub), în cazul unui examen bacterioscopic negativ, se vor face însămînțări pe medii care permit izolarea altor bacterii ce pot cauza meningite: de ex. bulionul Levinthal xx) pentru izolarea H.influenzae, bulion VF cu acid thioglicolic pentru izolarea anaerobilor.

Hemoculturile vor fi efectuate în bulion infuzie cord-creier și incubate la 37°C, în atmosferă cu 5% CO_2. Ele vor fi urmărite

---

x) Agar 2,5% topit și răcit la 45°C la care se adaugă 10% sînge; amestecul se ține la baia de apă (45°C) și se ridică temperatura la 80°C, atingerea sa realizîndu-se în 30 minute.

xx) Infuzie cord-creier cu proteoză peptonă, dextroză, NaCl, PO_4Na_2 și sînge defibrinat de cal 10%

Scanned with OKEN Scanner

pînă la 10 zile, macroscopic, microscopic şi prin treceri pe medii solide.

Exsudatul faringian recoltat de la purtători va fi însămînţat pe mediile Mueller-Hinton sau HYL selective x), incubarea culturii făcîndu-se în aceleaşi condiţii ca pentru l.c.r.

d. <u>Identificarea</u> tulpinii izolate se face pe baza unor criterii care permit încadrarea în genul <u>Neisseria</u> şi definirea speciei.

i. <u>Identificarea de gen</u> se realizează pe baza aspectului coloniilor, verificat microscopic - frotiu colorat Gram - şi prin testul oxidazei: se prelevă o colonie cu ansa de platină şi se depune prin frecare pe o hîrtie de filtru impregnată cu soluţie de tetrametilparafenilendiamină; reacţia pozitivă (oxidază prezentă), caracteristică pentru genul <u>Neisseria</u>, se traduce prin apariţia, în interval de 5-10 secunde, a unei culori albastre.

ii. <u>Identificarea de specie</u> se face prin testul de fermentare a zaharurilor (tabelul VII): <u>N.meningitidis</u> fermentează glucoza

Tabelul VII. Caractere de diferenţiere între unele specii încadrate în genurile <u>Neisseria</u> şi <u>Branhamella</u>

Specia	Producerea de pigment galben	Fermentarea zaharurilor cu formare de acizi					Dezvoltarea pe medii simple la 22°C
		G.	M.	L.	Z.	Lac.	
N.gonorrhoeae	-	+	-	-	-	-	-
N.meningitidis	-	+	+	-	-	-	-
N.lactamica	+	+	+	-	-	+	+
N.sicca	v	+	+	+	+	-	+
N.subflava	+	+	+	v	v	-	+
N.mucosa	v	+	+	+	+	-	+
N.flavescens	+	-	-	-	-	-	+
B.catarrhalis	-	-	-	-	-	-	+

G=glucoză; M=maltoză; L=levuloză; Z=zaharoză; Lac.=lactoză; v=comportare variabilă.

şi maltoza, spre deosebire de <u>N.gonorrhoeae</u> care metabolizează nu-

---

x) Caracterul selectiv al mediilor se obţine prin adaos de antibiotice: lincomicină (inhibă flora de asociaţie gram-pozitivă) şi colimicină (inhibă cultivarea bacililor gram-negativi), cîte 7 ug/100 ml mediu

Scanned with OKEN Scanner

mai glucoza. Neisseriile „nepretențioase" prezintă variate spectre fermentative; B.catarrhalis x) este azaharolitică (vezi tabelul VII).

iii. Identificarea serologică de grup prezintă interes epidemiologic și se practică printr-o reacție de aglutinare pe lamă cu seruri antimeningococice de grup. In prezent se cunosc mai multe serogrupuri de meningococ stabilite pe baza polizaharidului capsular: A,B,C,D,X,Y,Z,Z' și W_{135}. Izolatele de la bolnavi cu meningită aparțin aproape exclusiv la 5 serogrupuri: A,B,C, și mai puțin frecvent W_{135} și Y, în timp ce celelalte serogrupuri sînt în special izolate de la purtători.

e. Metode rapide de diagnostic. Probele de l.c.r. cu examen bacterioscopic negativ dar cu reacție inflamatorie predominant polimorfonucleară, cu hipoglicorahie și proteinorahie mult crescută vor fi examinate pentru decelarea antigenelor polizaharidice de grup. In acest scop se va utiliza imunoelectroforeza contracurent cu seruri monovalente de grup A,B și C sau coaglutinarea S.aureus cuplat cu aceste seruri. Ultima metodă se particularizează prin rapiditate (rezultat în 1-3 minute) și simplitate, putîndu-se practica la patul bolnavului, în momentul puncției lombare.

f. Sensibilitatea la antibiotice. Meningococii și-au păstrat încă sensibilitatea naturală la antibiotice cu bună penetrabilitate în l.c.r.: penicilina G, ampicilina, cloramfenicolul. Cea mai folosită în terapia meningitei este penicilina G care poate fi administrată pe baza rezultatului pozitiv furnizat de examenul microscopic.

B. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE NEISSERIA GONORRHOEAE

N.gonorrhoeae (gonococul) determină infecții numai la om, transmise aproape exclusiv pe cale sexuală de aceea mucoasa genitală este sediul de elecție al infecției.

La bărbat, infecția se localizează inițial la uretra anterioară evoluînd cu simptome clinice de uretrită acută în 90-95% din

x) Asemănătoare morfologic cu N.meningitidis, B.catarrhalis trebuie diferențiată de aceasta în unele cazuri de meningită deoarece multe tulpini sînt rezistente la penicilină prin producere de beta-lactamază.

cazuri. Netratată corect şi la timp, infecţia se poate extinde la prostată, epididim şi de asemeni se cronicizează generînd apariţia de stricturi uretrale.

La femeie, infecţia localizată iniţial la nivelul uretrei, glandelor lui Skene şi Bartholin, se extinde la vagin, eventual la cervix şi trompele uterine. Ea evoluează asimptomatic în aproximativ 60% din cazuri.

Dintre localizările extragenitale ale infecţiei gonococice menţionăm ano-rectita şi faringita x) care survin după raporturi sexuale anormale, conjunctivita adultului transmisă prin intermediul mîinilor contaminate şi oftalmia nou-născutului contractată de copil la trecerea prin canalul de naştere infectat al mamei.

Infecţia gonococică poate evolua şi bacteriemic,cu localizări metastatice articulare (posibil şi la nivelul articulaţiei temporo-mandibulare), meningiene, cutanate, endocardice.

Diagnostic bacteriologic

a. Recoltarea produselor patologice. In funcţie de localizarea infecţiei se vor preleva: secreţii de la nivelul uretrei, glandelor Skene şi Bartholin, colului uterin, rectului, conjunctivei, exsudat faringian, articular. La bolnavii cu infecţie bacteriemică şi artrite se vor face hemoculturi.

La bărbat, secreţia uretrală (cu aspect purulent, gălbuie, cremoasă) se recoltează cu ansa; în cazul unei secreţii reduse se va utiliza un tampon subţire de 2-3 mm Ø, care va fi introdus pe canalul uretral pe o distanţă de 1-2 cm de la meat. Recoltarea se va face dimineaţa, înainte de micţiune şi fără toaletă prealabilă.

La femeie, produsul se recoltează din endocol pe masa ginecologică: după o prealabilă îndepărtare a secreţiilor vaginale de pe col, acesta se comprimă între valvele unui speculum steril pentru a exprima secreţia endocervicală; se va avea grijă ca proba să nu se contamineze cu flora vaginală.

b. Examenul microscopic direct permite stabilirea diagnosticului etiologic, îndeosebi în uretrita acută la bărbat, prin examinarea frotiurilor din secreţia uretrală,colorate Gram şi cu al-

---

x) Gonococia faringiană se poate prezenta ca o angină eritematoasă febrilă, cu adenopatie submanibulară sau laterocervicală.In literatură sînt semnalate şi cîteva cazuri de stomatită gonococică

bastru de metilen. Pe frotiu apar numeroase polimorfonucleare şi caracteristică este prezenţa diplococilor gram-negativi cu aspect de „boabă de cafea" în număr mare, intracelular (celule „burate") (fig.51, a).

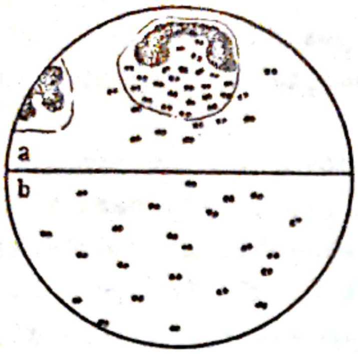


Fig.51 N.gonorrhoeae
a. frotiu din produs
b. frotiu din cultură

c. Izolarea N.gonorrhoeae pe medii de cultură se practică în infecţiile cronice deoarece în aceste cazuri examenul microscopic direct este dificil de interpretat: număr redus de polimorfonucleare şi diplococi extracelulari cu morfologie modificată. Insămînţarea produselor se face extemporaneu [x)] pe medii preîncălzite la termostat. La noi în ţară se foloseşte mediul HYL care este un agar la care se adaugă supliment tip HYL (sînge lacat de cal, autolizat de drojdie de bere şi autolizat de ficat de porc) în proporţie de 10%. Deoarece produsele patologice prezintă o bogată floră de contaminare se recomandă însămînţarea concomitentă pe mediul HYL făcut selectiv prin adaos de antibiotice: lincomicină şi colimicină. In lipsa mediului HYL se poate folosi agar cu sînge de cal 10% sau agar-şocolat.Plăcile sînt plasate într-un recipient ermetic închis, într-o atmosferă umedă cu 5% CO_2 şi incubate la 35-36°C, 24-48 ore.

d.Identificarea se face pe baza unor criterii care permit încadrarea în genul Neisseria şi definirea speciei.

i.Identificarea de gen se realizează prin:

- aspectul macroscopic al coloniilor: convexe, strălucitoare, translucide, alb-cenuşii, fin granulare, de 0,6-1 mm Ø;
- examenul microscopic al frotiului din cultură colorat Gram: diplococi ovalari cu axul longitudinal paralel (în „boabe de cafea"), gram-negativi (fig.51, b);
- testul oxidazei pozitiv.

ii.Identificarea de specie se realizează prin:

---

x) In cazul necesităţii de a transporta produsele la distanţă se vor folosi medii de transport (ex. mediul Stuart) care menţin viabilitatea gonococilor cca 24-48 ore; transportul se va face la temperatura de 20-25°C

- determinarea spectrului de fermentare a zaharurilor: gonococul fermentează numai glucoza.

Ca metode rapide de identificare se pot folosi:

- testul de imunofluorescență sau reacția de coaglutinare („Phadebact gonococcus test").

e. Sensibilitatea la antibiotice. Gonococul este natural sensibil la penicilină dar s-a constatat în timp o creștere treptată a valorilor CMI de la 0,003 µg/ml (în momentul introducerii terapiei cu penicilină) pînă la 2 µg/ml și mai mult în prezent. Din 1976, literatura consemnează apariția, în unele zone ale globului, a unor tulpini producătoare de penicilinază, ceea ce face inoperant tratamentul cu penicilină.

In general, în gonoreea necomplicată penicilina G constituie încă antibioticul de elecție. In cazul unor infecții cu tulpini rezistente la penicilină, alegerea unui alt antibiotic (spectinomicină, vibramicină, rifampicină, cefalosporine etc.) se va face pe baza indicațiilor antibiogramei.

XI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE COCOBACILI GRAM-NEGATIVI

Cocobacilii gram-negativi sînt reuniţi în mai multe genuri cu implicaţii în patologia infecţioasă umană. In acest capitol ne vom referi numai la genurile Haemophilus şi Actinobacillus care cuprind specii ce pot cauza infecţii în teritoriul buco-maxilo-facial.

A. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR PRODUSE DE HAEMOPHILUS INFLUENZAE

In genul Haemophilus se încadrează cocobacili gram-negativi cu marcant pleomorfism (bacili scurţi şi forme filamentoase), imobili, nesporulaţi. Bacterii aerobe, facultativ anaerobe, hemofilii necesită pentru cultivare factori de creştere, factorul X (protoporfirina sau protothemul) termostabil şi/sau factorul V (nicotinamidadenindinucleotidul) termolabil, care pot fi eliberaţi din hematii sub acţiunea căldurii (agar-şocolat, agar Levinthal) sau prin digestie pepsică (agar Fildes).

H.influenzae este un comensal frecvent al naso-faringelui la persoane sănătoase, care se comportă ca un condiţionat patogen determinînd, în anumite condiţii favorizante (de ex. secundar unor viroze), infecţii ale căilor respiratorii (nasofaringite, sinusite, inclusiv maxilare, bronşite, pneumonii), celulite faciale, osteomielite, otite etc. La copilul mic (între 2 luni şi 3 ani), H.influenzae, serotip b, se comportă ca o bacterie cu rol patogen primar cauzînd infecţii severe: epiglotite (laringite obstructive), septicemii, meningite.

In cadrul diagnosticului de laborator, exclusiv bacteriologic, H.influenzae trebuie diferenţiat de alţi comensali ai nasofaringelui: H.haemolyticus, H.parainfluenzae şi H.parahaemolyticus, rar implicaţi în infecţii ale tractusului respirator şi endocardi-

te subacute, precum şi de: H.aphrophilus şi H.paraphrophilus, constituienţi ai microbiotei indigene a cavităţii bucale, care pot determina ocazional osteomielite ale maxilarelor şi endocardite subacute.

Genul Haemophilus mai include 2 specii patogene: H.aegyptius, agentul cauzal al unei conjunctivite acute contagioase, care evoluează sub formă de epidemii sezoniere în regiunile subtropicale, şi H.ducreyi, agentul etiologic al şancrului moale, boală cu transmitere sexuală, rar întîlnită în zona noastră geografică.

Diagnostic bacteriologic

a. Examenul microscopic. Produsele patologice, reprezentate de spută, l.c.r., aspirat sinusal, secreţie otică, exsudat laringian etc., sînt supuse unui examen morfotinctorial. Frotiul colorat Gram evidenţiază cocobacili sau bacili mici (0,5-3 µm 1/0,3-0,5 µm ø), gram-negativi, nesporulaţi, capsulaţi, dispuşi izolat, în perechi, în scurte lanţuri sau în grupuri de elemente paralele („bancuri de peşti") (fig.52).

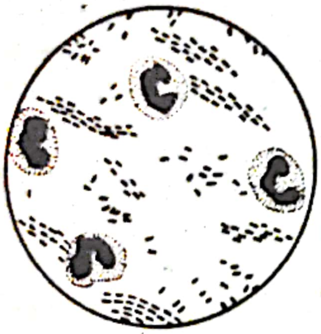


Fig.52 H.influenzae
Frotiu din spută

b. Izolarea. Produsele normal necontaminate ca l.c.r., lichide seroase, vor fi însămînţate pe agar-şocolat iar hemoculturile se vor efectua în bulion cord-creier la care se adaugă factorii de creştere X şi V. Pe agar-şocolat, după 24 ore de incubare la 37°C, aerob sau în atmosferă îmbogăţită cu 5-10% CO_2, apar colonii mici (0,5-1 mm ø), de tip S, rotunde, convexe, lucioase, cenuşii, translucide. Tulpinile capsulate dezvoltă, de obicei, colonii mai mari (1-3 mm ø), mai mucoide, cu tendinţă la confluare; pe medii transparente, ca agar Levinthal, coloniile prezintă, în iluminare oblică, o irizaţie caracteristică. Lichidul cefalorahidian mai poate fi însămînţat pe o placă cu agar-sînge la suprafaţa căreia se trasează un striu transversal cu S.aureus, sursă de factor V. H.influenzae se dezvoltă mai abundent în vecinătatea striului de stafilococ (fenomen de satelitism).

In cazul produselor contaminate (spută, exsudate), pentru a facilita izolarea H.influenzae, se foloseşte un mediu selectiv: agar-şocolat cu 300 mg/l bacitracină care inhibă dezvoltarea bacte-

riilor gram-pozitive.

c. Identificarea tulpinilor izolate se realizează pe baza caracterelor morfotinctoriale, de cultură şi antigenice. Se cunosc 6 tipuri serologice de H.influenzae (a-f) stabilite pe baza antigenului polizaharidic capsular, tipul b fiind cel mai frecvent implicat în infecţii; identificarea serotipului se practică printr-o reacţie de aglutinare pe lamă sau o reacţie de coaglutinare, utilizînd seruri imune specifice de tip.

Un diagnostic rapid în meningite poate fi stabilit printr-o reacţie de coaglutinare, latexaglutinare x) sau prin imunoelectroforeză contracurent care permit decelarea antigenului polizaharidic capsular de tip b în l.c.r., chiar după începerea tratamentului cu antibiotice.

Pentru diferenţierea H.influenzae de alţi hemofili comensali ai tractusului respirator superior şi cavităţii bucale se va ţine seama de necesităţile în factori de creştere V şi X şi de unele caractere de cultură (tabelul VIII).

Tabelul VIII. Caractere diferenţiale ale unor specii din genul Haemophilus izolate de la om

Caractere		H.influenzae	H.para-influenzae	H.haemolyticus	H.para-haemolyticus	H.aphrophilus	H.para-phrophilus
Necesităţi în factori de creştere	V	+	+	+	+	-	+
	X	+	-	+	-	+	-
Hemoliza *)		-	-	+	+	-	-
CO_2 la izolare		-	-	-	-	+	+

*) Pe geloză-sînge

Pentru implicarea etiologică într-o infecţie respiratorie a unei tulpini de H.influenzae izolată din spută sau exsudat faringian, produse în care acest microb poate fi prezent ca contami-

x) Particulele de latex (0,81 μ Ø) învelite cu anticorpi sînt aglutinate de antigenul specific

nant normal, se va ţine seama de 2 criterii importante: prezenţa la examenul microscopic al produselor patologice a bacteriilor capsulate şi predominanţa numerică a hemofililor faţă de restul florei microbiene (> 10 hemofili/cîmp microscopic).

d. Sensibilitatea la antibiotice. H.influenzae este natural sensibil la numeroase antibiotice cu spectru larg: ampicilină, cloramfenicol, tetracicline, cefalosporine, rifampicină etc. Semnalarea în ultimii ani a unui număr important de tulpini rezistente la ampicilină (prin elaborare de beta-lactamază) şi sporadic şi la cloramfenicol, medicamente de elecţie în tratamentul meningitelor, impune practicarea antibiogramei la orice tulpină infectantă izolată.

B. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS

Genul Actinobacillus include cocobacili sau bacili scurţi, gram-negativi, imobili, nesporulaţi, necapsulaţi, microaerofili.

Singura specie cu habitat uman, constituient al microflorei normale din cavitatea bucală, este A.actinomycetemcomitans. Acesta se comportă ca un condiţionat patogen, fiind implicat în ultimii ani în patogenia parodontitei juvenile. Ocazional a fost izolat din cazuri de endocardită subacută, meningite, sinusite şi infecţii ale maxilarelor.

Diagnosticul de laborator este exclusiv bacteriologic, folosind ca produse patologice, în funcţie de localizarea infecţiei: secreţie gingivală, sînge, l.c.r., puroi.

a. Examenul microscopic evidenţiază prezenţa de bacili mici (0,4 μm Ø/1,5 μm l), dispuşi izolat sau în perechi, rar în lanţuri, gram-negativi (fig.53).

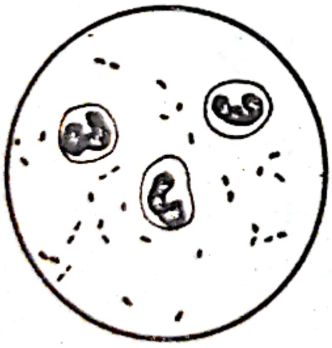


Fig.53
A.actinomycetemcomitans
Frotiu din secreţie gingivală

b. Izolarea. Pentru izolarea A.actinomycetemcomitans din leziuni parodontale se foloseşte mediul selectiv Slots: agar-sînge-tripticază-soia cu bacitracină şi verde malachit. Mediul însămînţat se incubează în anaerobioză sau în atmosferă îmbogăţită cu 5-10% CO_2. Coloniile sînt mici (1 mm Ø după 2-3 zile), de tip S, convexe, opace, alb-cenuşii, ade-

rente la mediu.

Hemocultura, practicată în bulion cord-creier, este incubată în atmosferă de CO_2 sau în anaerobioză, după care se fac treceri pe agar-şocolat sau agar-sînge; coloniile sînt mici, uşor convexe, translucide, nehemolitice.

c. Identificarea tulpinii izolate se face pe baza unor criterii care permit încadrarea în genul *Actinobacillus* şi definirea speciei.

i. Identificarea de gen se realizează pe baza caracterelor morfotinctoriale şi de cultură (aderenţa coloniilor la mediu şi dezvoltarea pe agar Mac Conkey diferenţiază bacteriile din genul *Actinobacillus* de alţi cocobacili gram-negativi).

ii. Identificarea de specie se face pe baza unor caractere biochimice. Fermentarea unor zaharuri, galactoză, manitol şi xiloză, permite definirea a 8 biotipuri.

d. Sensibilitatea la antibiotice. *A.actinomycetemcomitans* este sensibil la tetracicline (antibioticul de elecţie în tratamentul parodontitei juvenile), cloramfenicol, streptomicină, eritromicină, polimixină B şi novobiocină. Unele tulpini sînt sensibile la penicilină şi la unele cefalosporine (ex. cefazolin).

XII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CU BACILI GRAM-NEGATIVI FACULTATIV ANAEROBI DIN FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

In familia Enterobacteriaceae se încadrează numeroase genuri cu habitat natural sau ocazional în intestinul omului şi animalelor x). Unele genuri includ specii patogene pentru om: *Salmonella*, *Shigella* şi *Yersinia* iar altele, specii condiţionat sau accidental patogene: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* etc.; din ultimul grup de enterobacteriacee se pot selecta, în mediul de spital, tulpini agresive, multirezistente la antibiotice.

Enterobacteriaceele au următoarele caractere generale: bacili gram-negativi, nesporulaţi, de 1-6 /um 1/0,3-1 /um Ø, cu capete rotunjite, dispuşi de obicei izolat, majoritatea necapsulaţi şi mobili. Cultivă pe medii simple, fermentează glucoza cu sau fără producere de gaz şi reduc nitraţii în nitriţi. Comportarea diferită faţă de lactoză îi împarte în 2 mari grupuri:

lactozo-negativi	şi	lactozo-pozitivi
Salmonella		Escherichia
Shigella		Klebsiella
Yersinia		Enterobacter
Providencia		Citrobacter etc.
Proteus		
Serratia xx)		
Edwardsiella etc.		

---

x) Face excepţie *Yersinia pestis*, agentul etiologic al pestei sau ciumei, boală epizootică a rozătoarelor transmisă omului prin înţepătura puricelui de şobolan

xx) Unele tulpini din cadrul genului pot fermenta lactoza

Scanned with OKEN Scanner

A. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL FEBRELOR ENTERICE

Febrele enterice sînt boli infecţioase specifice omului, cu evoluţie endemo-epidemică şi mai rar sporadică, cauzate în mod obişnuit de S.typhi - febra tifoidă, şi mai rar de S.paratyphi A, S.paratyphi B (S.schottmuelleri) şi S.paratyphi C (S.hirschfeldii) - febrele paratifoide.

Salmonelele sînt bacterii cu proprietăţi invazive şi tropism intestinal. Ajunse în intestinul subţire, consecutiv consumului de apă sau alimente contaminate fecal, străbat bariera mucoasă şi pătrund în submucoasă pînă la plăcile Payer unde sînt captate de macrofage în interiorul cărora se înmulţesc x); microbii sînt apoi mobilizaţi în ganglionii mezenterici de unde, prin canalul toracic, trec în sînge determinînd bacteriemia iniţială şi invadarea întregului sistem limfatic (măduvă, splină, ficat). Multiplicarea în aceste organe determină a doua bacteriemie cu eliminarea salmonelelor prin bilă şi urină. Prin bilă şi din ganglionii mezenterici abcedaţi salmonelele ajung, la sfîrşitul primei săptămîni de boală, în lumenul intestinal de unde se elimină prin materii fecale, excreţia acestora prelungindu-se pînă în convalescenţă şi uneori mult timp după aceea (purtători cronici).

Boala debută insidios, după o incubaţie de aproximativ 10 zile, cu oboseală, anorexie, cefalee, febră treptat ascendentă, disconfort abdominal, constipaţie. Perioada de stare, care durează 2-3 săptămîni, se caracterizează prin febră în platou (în jur de 39°C), bradicardie, hipotensiune, leucopenie, erupţie discretă lenticulară în regiunea toraco-abdominală, stare tifică; bolnavul prezintă scaune diareice. In cazurile cu evoluţie favorabilă, febra scade „in lizis" marcînd începutul perioadei de convalescenţă care este de lungă durată (4-6 săptămîni).

Uneori pot surveni complicaţii care pun în pericol viaţa bolnavului: hemoragii şi perforaţii intestinale consecutive necrozei şi ulceraţiei mucoasei intestinale şi a plăcilor Payer. Aceste complicaţii, alături de febră, leucopenie, erupţie cutanată, stare tifică, sînt considerate manifestări de sensibilizare la acţiunea endotoxinei (vezi structura antigenică a salmonelelor), eliberată local şi în circulaţie prin liza bacililor tifici în interiorul macrofagelor „activate".

Diagnosticul de laborator se practică prin metode bacteriologice şi serologice în funcţie de stadiul evolutiv al bolii (tabelul IX).

---

x) Salmonelele sînt bacterii „facultativ intracelulare"

Tabelul IX FRECVENȚA EXAMENELOR POZITIVE IN DIFERITE STADII EVOLUTIVE LA BOLNAVII DE FEBRA TIFOIDA, CONVALESCENȚI SI PURTATORI

	Examene	Bolnavi în saptămîna I	II	III	IV	convalescenți	purtători cronici
Bacterio-logice	Hemocultura	+++	++	+	±	–	–
	Coprocultura	+	++	+++	+	+	±
	Urocultura	–	±	+	+	±	–
	Bilicultura	×	×	×	×	±	±
	Medulocultură*	+	+	+	±	×	×
Sero-logice	RASC	±	++	+++	+++	+++	×
	RAVi	×	×	×	×	+++	+

* Se practică numai cînd hemoculturile au fost negative

Legendă: — Examene pozitive în procent de: peste 75% +++; 50–75%: ++; 25–50%: +; sub 25% ±
— Examene negative: –;
— Nu se recomandă: ×.

1. **Diagnostic bacteriologic**

a. Izolarea. Alegerea produsului patologic este în funcție de etapa de boală. Pe toată durata perioadei febrile se poate efectua hemocultura, în bulion cu adaos de 0,025% polianetolsulfonat de sodiu, dar cel mai mare procent de pozitivitate (vezi tabelul IX) este obținut în primele 2 săptămîni de boală; medulocultura dă și ea un procent ridicat de pozitivitate dar este utilizată numai cînd hemoculturile au rămas negative.

Pe toată durata bolii, în convalescență, ca și pentru depistarea purtătorilor sănătoși, se practică coprocultura. De asemenea, începînd din a doua săptămînă de boală, se poate utiliza urocultura. Bilicultura este utilă în cazul convalescenților și purtătorilor cronici.

Atît materiile fecale, cît și urina sau bila (în prealabil centrifugate) se însămînțează în paralel pe un mediu de îmbogățire: bulion cu selenit acid de sodiu și pe cel puțin două medii selective: mediul WB x) indicat pentru izolarea bacilului tific

x) WB (Wilson-Blair): geloză cu verde brillant și citrat de bismut.

şi un mediu la alegere din următoarele medii: ADCL, SS sau MC x).
După 24-48 ore de incubaţie la 37°C se urmăreşte aspectul culturii pe mediile solide. Salmonelele se dezvoltă sub formă de colonii mici (1-3 mm Ø), rotunde, netede, translucide, lactozo-negative (nu modifică culoarea mediilor). In cazul producerii de H_2S, coloniile sînt negre cu halou metalic (mediul WB) sau prezintă o zonă centrală de culoare neagră (mediul ADCL).

Dacă pe mediile selective nu s-a obţinut cultivarea se fac din nou treceri de pe mediile de îmbogăţire.

Coloniile lactozo-negative obţinute, ca şi cultura în bulion (în cazul hemoculturii şi medulocultúrii) vor fi însămînţate pe medii multitest: TSI şi MIU xx), pentru identificare biochimică.

b. Identificarea se realizează pe baza caracterelor morfotinctoriale şi de mobilitate, biochimice şi serologice:

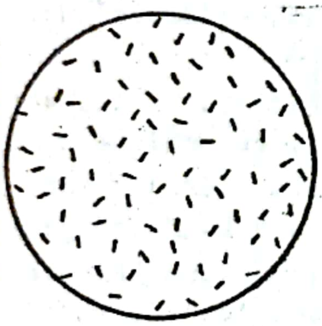


Fig.54 S.typhi
Frotiu din cultură

- caractere morfotinctoriale. Salmonelele sînt bacili gram-negativi, de 2-4 µm l/0,5 µm Ø, cu capete rotunjite, dispuşi izolat, necapsulaţi (fig.54);

- caractere biochimice. Aceste caractere se verifică în primul rînd pe 2 medii multitest: TSI şi MIU.

Mediul TSI repartizat în eprubete şi solidificat în coloană şi pantă permite în porţiunea înclinată evidenţierea fermentării lactozei şi/sau zaharozei iar în porţiunea dreaptă producerea de H_2S şi fermentarea

---

x) ADCL (Agar-Dezoxicolat-Citrat-Lactoză) = geloză lactozată, dezoxicolat de Na, citrat de Na şi Fe, hiposulfit de Na; indicator: roşu-neutru

SS (Salmonella-Shigella) = geloză lactozată cu săruri biliare şi verde brillant; indicator: roşu-neutru

MC (Mac Conkey) = geloză lactozată cu săruri biliare şi cristal violet; indicator: roşu-neutru

xx) TSI (Triple Sugar Iron) = agar cu 3 zaharuri (glucoză, lactoză, zaharoză) şi sulfat feros; indicator: roşu-fenol

MIU (Mobilitate-Indol-Urează) = geloză pe bază de peptonă bogată în triptofan, uree şi roşu-fenol. Pentru decelarea producerii de indol se ataşează la dopul eprubetei o bandă din hîrtie de filtru cu un capăt galben impregnat în reactiv Ehrlich; în cazul unei reacţii pozitive, porţiunea galbenă a benzii se înroşeşte

glucozei cu sau fără gaz. Salmonelele nu fermentează lactoza și zaharoza lăsînd culoarea pantei nemodificată; în schimb fermentează glucoza cu producere de gaz (excepție S.typhi), ceea ce determină virarea culorii coloanei de mediu din roșu în galben și fragmentarea sa de către bulele de gaz. Salmonelele care produc H_2S: S.schottmuelleri și unele tulpini de S.typhi înnegresc traiectul de însămînțare sau chiar întreaga coloană a mediului.

Mediul MIU este un mediu transparent, de culoare galben-maronie; el este repartizat în eprubete, cîte 3-4 ml, și solidificat în poziție dreaptă. Pe acest mediu se verifică mobilitatea, producerea de indol și de urează. Salmonelele sînt mobile (ceea ce se traduce prin opacifierea mediului), nu produc indol (banda de hîrtie introdusă în eprubetă nu-și modifică culoarea) și nici urează (mediul rămîne galben).

In completare mai pot fi studiate și alte caractere biochimice (tabelul X);

- caractere serologice. Un bacil gram-negativ, mobil, care se dezvoltă pe medii simple, fermentează glucoza cu producere de gaz, este lactozo-negativ, indol și urează-negativ, orientează diagnosticul către o specie de salmonelă. Pentru a confirma această supoziție, cultura de pe mediul TSI va servi la identificare serologică. Pentru a înțelege metodologia acestei identificări este necesar a prezenta succint structura antigenică a salmonelelor. Acestea posedă 3 antigene principale:

Antigenul somatic O, un antigen de perete, de natură glucidică, termostabil și distrus de formol. Pe baza acestui antigen, genul Salmonella a fost împărțit în peste 60 grupuri serologice, notate cu literele mari ale alfabetului de la A-Z și cu numere de la 51 la 67.

Antigenul Vi (de virulență), de asemenea un antigen de perete, polizaharidic, situat mai superficial decît antigenul O pe care îl maschează atunci cînd este în cantitate mare, ceea ce conferă tulpinilor respective inaglutinabilitate-O. Antigenul Vi este termolabil și distrus de fenol; el este prezent numai la 2 specii de Salmonella: S.typhi și S.hirschfeldii.

Antigenul H, flagelar, întîlnit numai la speciile mobile, de natură proteică, termolabil și distrus de alcool. Suferă feno-

TABEL X. CARACTERE BIOCHIMICE DIFERENTIALE ALE UNOR GENURI DIN FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

GENUL	m.T.S.I.			m. M.I.U.			m. CLARK LUBS		m. CITRAT SIMMONS	m. BLAKE - CHRISTENSEN	m. MOELLER
	FERM. LACTOZEI/ ZAHAROZEI	GAZ DIN GLUCOZĂ	H_2S	MOBILITATE	INDOL	PRODUCERE DE UREAZĂ	RM	VP	UTILIZAREA CITRATULUI CA UNICĂ SURSĂ DE CARBON	PRODUCERE DE FENILALANIN-DEZAMINAZĂ	PRODUCERE DE LIZIN-DECARBOXILAZĂ
SALMONELLA	-/-	+	+++(-)	+	-	-	+	-	+	-	+
S.TYPHI	-/-	-	+(-)	+	-	-	+	-	-	-	+
SHIGELLA	-/v	-	-	-	-(+)	-	+	-	-	-	-
PROTEUS	-/v	+	+++	+	+(-)	+	+	-	+(-)	+	-
PROVIDENCIA	-/v	-(+)	-	+	+	- +	+	-	+	+	-
MORGANELLA	-/-	+(-)	-	+	+	+	+	-	-	+	-
SERRATIA	-/+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
EDWARDSIELLA x)	-/-	+	+(-)	+	+	-	+	-	-	-	+
YERSINIA xx)	-/+	-	-	-/37°	+(-)	+	+	-	-	-	-
ESCHERICHIA	+/v	+(-)	-	+(-)	+	-	+	-	-	-	+(-)
KLEBSIELLA xxx)	+/+	++	-	-	-	+	-	+	+	-	+
CITROBACTER	+/v	+	+++	+	+(-)	+(-)	+	-	+	-	-

x) CARACTERE VALABILE PENTRU SPECIA E.TARDA

xx) " — " — " — " — " Y.ENTEROCOLITICA

xxx) " — " — " — " — " K.PNEUMONIAE

v = comportare variabilă în cadrul genului

( ) = în paranteză sînt indicate reacțiile mai rar întîlnite.

menul de variaţie de fază, fiind prezent sub 2 forme: specifică, „faza 1" (este specific diferitelor specii dintr-un anumit grup O) sau nespecifică, „faza 2" (este comun mai multor specii dintr-un grup serologic O sau din mai multe grupuri); antigenele fazei 1 sînt notate cu literele mici ale alfabetului iar cele ale fazei 2 cu cifre arabe. Antigenele H permit definirea în cadrul grupurilor O a serotipurilor [x].

Identificarea serologică se realizează inițial printr-o reacție de aglutinare pe lamă cu ser polivalent anti-O (ser care conține anticorpi față de grupurile serologice „majore": AO, BO, C_1O, C_3O, C_4O, D_1O, E_1O, E_2O, E_3O şi E_4O).In paralel se practică o reacție de aglutinare pe lamă cu serul anti-Vi (în cazul unei aglutinări pozitive pentru antigenul Vi dar a unei inaglutinabilități-O, pentru a elucida situația se repetă reacția de aglutinare O cu cultura încălzită 1 oră la 60°C, ceea ce permite distrugerea antigenului Vi şi demascarea antigenului O); apoi se practică aglutinarea cu seruri monovalente anti-O corespunzătoare grupurilor mai sus menționate. După ce Salmonella a fost încadrată într-un anumit grup serologic O, pentru a stabili serotipul se va face în continuare aglutinare cu seruri anti-H de fază 1 şi 2: de ex. dacă tulpina izolată, pe lîngă caracterele biochimice menționate mai sus, aglutinează cu ser anti-O de grup D_1 se va încerca aglutinarea cu serul H d care corespunde S.typhi (tabelul XI).

In caz de epidemii (febră tifoidă, toxiinfecții alimentare), în completarea diagnosticului, laboratoarele de referință pot efectua lizotipia ca metodă de diferențiere în cadrul serotipurilor, ceea ce permite stabilirea sursei de infecție şi precizarea filiației cazurilor.

c. Sensibilitatea la antibiotice. S.typhi este natural sensibilă la numeroase antibiotice cu spectru larg şi la sulfamide. In terapia febrei tifoide se utilizează ca antibiotic de elecție cloramfenicolul; la fel de active sînt ampicilina şi cotrimoxazolul. Semnalarea în ultimii ani a unor tulpini de S.typhi rezistente la cloramfenicol (şi în foarte rare cazuri şi la ampicilină), face necesară practicarea antibiogramei.

---

[x] Pînă în anul 1983 au fost stabilite peste 2100 serotipuri

TABEL XI STRUCTURA ANTIGENICĂ A UNOR SPECII DE SALMONELLA IZOLATE LA NOI ÎN ȚARĂ
Extras din schema KAUFFMANN - WHITE

Grup	Serotip	Antigen „O"	Antigen „Vi"	Antigen „H"	
				Faza 1	Faza 2
A	S.paratyphi A	1,2,12		a	1,5
B	S.schottmuelleri (S.paratyphi B)	1,4,(5),12		b	1,2
	S.typhimurium	1,4,(5),12		i	1,2
	S.heidelberg	1,4,(5),12		r	1,2
	S.agona	1,4,12		f,g,s	—
	S.wien	1,4,12,27		b	1,w
C_1	S.hirschfeldii (S.paratyphi C)	6,7	+	c	1,5
	S.cholerae-suis	6,7		(c)	1,5
	S.oranienburg	6,7		m,t	—
C_2	S.newport	6,8		e,h	1,2
	S.manchester	6,8		1,v	1,7
D_1	S.typhi	9,12	+	d	—
	S.enteritidis	1,9,12		g,m	1,7
	S.dublin	1,9,12		g,p	—
E_1	S.anatum	5,10		e,h	1,6
	S.london	3,10		1,v	1,6

2. Diagnostic serologic

Anticorpii apar în ser din a 2-a săptămînă de boală și ating titrul maxim în săptămîna a 4-a. Anticorpii anti-O dispar după 2-3 luni de la vindecare iar cei anti-H persistă ani de zile, anticorpii anti-Vi apar tardiv în cursul bolii și se mențin la un titru ridicat pe toată durata portajului microbian.

Serodiagnosticul se efectuează pe 2 probe de ser, una recoltată la internarea bolnavului suspect de febră enterică și alta după 7-10 zile. Se folosește reacția de aglutinare serică calitativă (RASC) care se practică concomitent cu antigenele O și H ale S.typhi, S.paratyphi A și S.paratyphi B (suspensiile microbiene sînt inactivate prin alcoolare și respectiv prin formolare (pentru tehnica reacției vezi cap.VI).

RASC este considerată sugestivă pentru diagnostic de la titrul 1/250 pentru anticorpii anti-O în cazul persoanelor nevaccinate antitifoidic (la persoanele cu antecedente vaccinale în ultimile 2-3 luni, reacția nu furnizează informații utile pentru diagnostic). Creșterea titrului anticorpilor la dublu în a 2-a probă de ser confirmă suspiciunea de febră tifoidă sau paratifoidă.

Pentru depistarea purtătorilor cronici se folosește reacția de aglutinare cu antigen Vi (RAVi). Un titru mai mare de 1/40 este considerat semnificativ pentru diagnostic și impune repetarea coproculturii dacă aceasta a fost negativă.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ALTOR INFECTII SALMONELOZICE

In afară de febrele enterice, reprezentanții genului Salmonella mai pot cauza toxiinfecții alimentare și septicemii.

a. Toxiinfecțiile alimentare apar cel mai frecvent ca izbucniri epidemice după consumul unor alimente (carne, lapte, ouă de rață, pește, etc.), intens contaminate cu diferite specii de Salmonella: S.typhimurium (cauzează aproximativ 60% din toxiinfecții în Europa și la noi în țară), S.enteritidis, S.agona, S.choleraesuis, S.panama, S.anatum etc. Boala debutează brusc, după o incubație de 6-48 ore și evoluează ca o gastroenterită acută cu grețuri, vărsături, scaune diareice, febră; durează în medie 2-3 zile.

Diagnosticul se stabilește prin examenul bacteriologic al probelor de materii fecale și alimentelor.

b. Septicemiile salmonelozice pot apare la copilul mic, în special la sugar, precum și la organisme adulte cu rezistența antiinfecțioasă scăzută, în cursul unei toxiinfecții alimentare. Ar fi de semnalat unele septicemii cauzate de S.choleraesuis care, pătrunsă în organism pe cale digestivă, poate invada sîngele fără a afecta mucoasa intestinală (absența simptomelor digestive).

In cursul septicemiei sînt posibile localizări metastatice (meningite, osteomielite, pleurezii, abcese viscerale etc.).

Diagnosticul se stabilește prin hemocultură, practicată după aceleași principii ca și în cazul febrelor enterice.

B. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIZENTERIEI BACILARE

Dizenteria este o boală enterică cu rezervor predominant

uman[x]), cauzată de bacili gram-negativi din genul Shigella, care evoluează de obicei endemo-epidemic.

Shigelele sînt microbi cu proprietăţi invazive, ca şi salmonelele, dar cu tropism pentru mucoasa intestinului gros. Ajungi la acest nivel, în urma consumului de apă şi alimente contaminate fecal, ei se multiplică intens în enterocit antrenînd leziuni ulcerative ale mucoasei.

Boala debutează brusc, după o incubaţie de 2-4 zile, cu dureri abdominale, tenesme, scaune frecvente mucosangvinolente, febră şi deshidratare. In dizenteria cu Sh.dysenteriae 1 se mai adaugă o stare toxică datorită elaborării unei exotoxine neuro-enterotrope, ceea ce imprimă o gravitate deosebită bolii.

Boala evoluează spre vindecare spontană în 2-4 zile la cei mai mulţi pacienţi şi numai un număr redus din foştii bolnavi rămîn purtători cronici.

Diagnosticul de laborator în dizenterie este exclusiv bacteriologic.

Diagnostic bacteriologic

a. Izolarea. Produsul patologic este reprezentat de materii fecale care vor fi însămînţate în prima oră de la recoltare [xx]) deoarece bacilii dizenteriei sînt rapid distruşi de fagii specifici prezenţi în scaun, ca şi de concurenţa realizată de flora normală a intestinului. Probele ce urmează a fi însămînţate se pot recolta din scaunul emis spontan, alegîndu-se porţiunile mucosangvinolente, din rect cu sonda Nelaton sau cu ajutorul tamponului în cursul rectoscopiei, direct de la nivelul ulceraţiilor rectosigmoidiene.

Coprocultura se efectuează pe cel puţin 2 medii selective: IM [xxx]), mediul SS sau ADCL. După 24 ore, un număr cît mai mare de colonii lactozo-negative vor fi repicate pe sectoare de mediu IM,

---

x) Dintre animale se îmbolnăvesc în mod natural numai maimuţele care pot elimina bacili dizenteriei

xx) Dacă nu este posibilă însămînţarea imediată, se va folosi un mediu de transport (Cary-Blair sau lichid conservant glicerinat tamponat)

xxx) IM (Istrati-Meitert) = geloză lactozată cu bilă uscată; indicator: albastru de bromthimol

precum şi pe medii multitest. De asemeni vor fi efectuate reacţii de aglutinare pe lamă.

b. Identificarea se realizează pe baza caracterelor morfo-tinctoriale, biochimice şi serologice:

- caractere morfotinctoriale: bacili gram-negativi de 2-3 /um 1/0,5 /um ø, necapsulaţi;

- caractere biochimice şi de mobilitate. Comportarea pe mediile TSI şi MIU (lipsa de fermentare a lactozei şi zaharozei după 24 ore, fermentarea glucozei fără gaz, neproducerea de H_2S şi urează, imobilitatea), ca şi studiul altor caractere biochimice (vezi tabelul X) permit identificarea genului. Pentru identificarea subgrupului se va cerceta fermentarea manitei şi producerea de indol (tabelul XII).

Tabelul XII. Unele caractere diferenţiale între subgrupele de Shigella

Subgrupul (specia)	Fermentarea zaharurilor		Producerea de indol
	Lactoză	Manita	
A (Sh. dysenteriae)	—	—	V
B (Sh. flexneri)	—	+	V
C (Sh. boydii)	—	+	V
D (Sh. sonnei)	(+)	+	—

(+)= Fermentare tardivă   V= Comportare variabilă a tulpinilor în cadrul speciei

Diferenţierea între subgrupele B şi C mai necesită studierea caracterelor antigenice;

- caractere serologice. Bacilii dizenteriei posedă un antigen somatic O, pe baza căruia genul Shigella a fost împărţit în 4 subgrupuri antigenice: A - Sh.dysenteriae (cu 10 serotipuri), B - Sh.flexneri (cu 6 serotipuri şi 9 subtipuri), C - Sh.boydii (cu 15 serotipuri) şi D - Sh.sonnei (cu 1 serotip). Unele serotipuri din subgrupele A şi B mai posedă un antigen K de înveliş care poate explica inaglutinabilitatea-O a unor tulpini.

Identificarea antigenică a shigelelor se face printr-o reacţie de aglutinare pe lamă mai întîi cu seruri neadsorbite, care permit încadrarea tulpinii izolate într-un anumit subgrup serolo-

gie (A,B,C sau D). Apoi, în cadrul fiecărui subgrup se va continua identificarea cu seruri aglutinante adsorbite monovalente în vederea identificării serotipurilor şi subtipurilor. La noi în ţară îmbolnăvirile sînt cauzate în special de Sh.flexneri, urmată de Sh.sonnei, de aceea identificarea serologică se va practica mai întîi cu seruri corespunzătoare acestor 2 subgrupuri;

- caractere de patogenitate. In completarea diagnosticului, tulpinile izolate pot fi identificate prin testul cheratoconjunctivitei sau testul Sereny. Acest test constă în inocularea în sacul conjunctival la cobai a unei culturi proaspete de Shigella de pe geloză; după 12-24 ore apare o congestie conjunctivală, secreţie mucopurulentă şi opacifierea corneei.

In cazul unei tulpini suspectată a aparţine speciei Sh.dysenteriae tip 1, laboratorul de referinţă va evidenţia producerea de exotoxină printr-un test practicat pe şoarecele alb.

c. Sensibilitatea la antibiotice. Shigelele sînt natural sensibile la antibiotice cu spectru larg şi la polimixine dar au fost puse în evidenţă tulpini multirezistente la antibiotice.

In cazurile de dizenterie benignă la adult se obţin bune rezultate cu antiseptice intestinale din grupul oxichinoleinelor: Saprosan, Mexaform, Mexază. In formele severe sau trenante, precum şi la copii şi bătrîni, se vor utiliza chimioterapice (cotrimoxazol) sau antibiotice (tetraciclinе, ampicilină) stabilite pe baza antibiogramei.

C. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE ENTEROBACTERIACEE CONDITIONAT SAU ACCIDENTAL PATOGENE

Enterobacteriaceele din acest grup se împart în raport cu capacitatea de a fermenta lactoza în lactozo-pozitive: Escherichia şi bacilii coliformi, şi lactozo-negative. Majoritatea sînt mobile (excepţie Klebsiella) şi necapsulate (excepţie Klebsiella şi unele tulpini de E.coli).

Escherichia coli, constituient major al microbiotei intestinale, este enterobacteria cea mai frecvent implicată în infecţii cu variate localizări la om: enterale şi extraenterale.

Infecţiile enterale pot fi cauzate, prin mecanisme diferite, de 3 grupuri de tulpini de E.coli:

- tulpini enterotoxigene, dotate cu capacitatea de a elabora enterotoxine: termolabilă, antigenică (LT) şi/sau termostabilă, neantigenică (ST); ele produc un sindrom diareic de tip holeriform: scaune apoase, fără dureri abdominale şi fără febră;

- tulpini enteroinvazive, care determină un sindrom diareic de tip dizenteriform: scaune mucosangvinolente, cu dureri abdominale şi febră, printr-un mecanism asemănător shigelelor;

- tulpini enteropatogene, prevăzute cu antigen B (componentă a antigenului de înveliş K), care cauzează enterite în special la sugar şi copilul mic (pînă la 2 ani). Cele mai frecvente serotipuri circulante la noi în ţară sînt: $O_{26}B_{6}$, $O_{55}B_{5}$, $O_{111}B_{4}$, $O_{119}B_{14}$, $O_{127}B_{6}$ şi $O_{128}B_{12}$.

Infecţiile extraenterale cele mai frecvente sînt infecţiile tractusului urinar [x)]: cistite, pielite, pielonefrite; acestea sînt cauzate de tulpini posesoare de pili care le permit aderenţa la receptorii celulelor uroepiteliale.

La nou-născut, E.coli poate determina septicemii şi meningite purulente, tulpinile izolate fiind cel mai adesea posesoare de antigen capsular K_1. De asemeni poate cauza infecţii ale plăgilor, arsurilor, apendicite, peritonite, otite medii, infecţii pulmonare, infecţii post-abortum sau post-partum, uneori cu generalizare septicemică şi şoc endotoxinic.

Bacilii coliformi, denumiţi astfel deoarece se aseamănă prin unele caractere cu E.coli, sînt un grup eterogen de bacili lactozo-pozitivi. Aici se încadrează genurile: Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter.

Din grupul enterobacteriilor condiţionat sau accidental patogene mai fac parte unele genuri lactozo-negative: Proteus, Morganella, Providencia, Edwardsiella, Serratia etc.

Atît bacilii coliformi, cît şi unele specii din genurile lactozo-negative pot cauza infecţii urinare, ale plăgilor, otite, pneumonii, enterite, infecţii bacteriemice cu localizări secundare meningeale, endocardice etc. Din genul Klebsiella, specia capsulată K.pneumoniae manifestă un potenţial de patogenitate mai important, serotipurile K_1, K_2 şi K_3 [xx)] determinînd pneumonii lobare

---

x) Aproximativ 90% din totalul infecţiilor tractusului urinar sînt produse de E.coli

xx) Pe baza antigenului de înveliş K au fost stabilite 77 serotipuri

acute severe.

Enterobacteriaceele comensale, condiţionat patogene, reprezintă o importantă cauză a infecţiilor nosocomiale.

Diagnosticul etiologic în toate infecţiile mai sus menţionate se stabileşte prin examen bacteriologic.

Diagnostic bacteriologic

Produsele patologice variază în raport cu localizarea infecţiei: materii fecale, urină, puroi, spută, l.c.r., sînge, etc. iar semnificaţia clinică a bacteriei izolate este în funcţie de condiţia microbiologică a produsului. Astfel în cazul probelor normal necontaminate (ex. l.c.r., sînge, puroi din colecţii închise), izolarea unui bacil gram-negativ în cultură pură este suficientă pentru implicarea sa etiologică; evidenţierea bacilului şi în examenul direct constituie un criteriu în plus de confirmare a diagnosticului. In cazul probelor contaminate (ex. urină, spută, puroi din plăgi, arsuri) se va ţine seama de criteriul cantitativ atît la examenul microscopic al produsului cît şi în cultură.

a. Examenul microscopic direct evidenţiază bacili gram-negativi de 1-3 μm/0,4-0,7 μm ∅, dispuşi izolat, morfologie comună speciilor din familia Enterobacteriaceae. La genul Proteus pot fi observate şi forme filamentoase. Examenul microscopic permite identificarea în frotiu numai a speciei K.pneumoniae: bacili gram-negativi scurţi şi groşi, capsulaţi, dispuşi în special în perechi (fig.55).

Fig.55 K.pneumoniae
Frotiu din produs

Implicarea etiologică a unui bacil gram-negativ comensal, prin examen microscopic, în cazul produselor contaminate (urină, spută), este condiţionată atît de numărul bacteriilor observate pe cîmp microscopic cît şi de importanţa reacţiei celulare inflamatorii x).

In cazul materiilor fecale, frotiul colorat Gram este lipsit de valoare diagnostică datorită habitatului normal intestinal al acestui grup de enterobacteriacee. In schimb colorarea frotiului cu anticorpi fluorescenţi constituie o metodă rapidă şi sensi-

x) Ex. prezenţa a cel puţin o bacterie şi un PMN/cîmp microscopic în cazul urinii şi a > 10 bacterii şi cel puţin 25 PMN/cîmp microscopic în cazul sputei

bilă de decelare a tulpinilor enteropatogene infantile de E.coli.

b. Izolarea se practică prin însămînțarea produselor pe agar-sînge și pe un mediu lactozat diferențial (ABTL) x) sau slab selectiv (Mac Conkey).

Pentru produsele contaminate este indicată însămînțarea cantitativă sau semicantitativă. Ex. urocultura cantitativă:

- din proba de urină corect recoltată (vezi cap.III) și bine agitată se face o diluție 10^{-2} în soluție salină izotonă sterilă;
- se pipetează 1 ml urină diluată într-o placă Petri sterilă;
- se adaugă 15-20 ml agar nutritiv topit și răcit la 45-50°C după care plăcile se agită pentru a omogeniza cît mai bine inoculum în mediul de cultură;
- după solidificare, plăcile se incubează la 37°C;
- a doua zi se numără coloniile dezvoltate.

Nr. UFC/ml urină = nr.coloniilor de pe placă x diluția.

Prezența a $\geq 10^5$ UFC/ml urină și existența piuriei este semnificativă pentru o infecție a tractusului urinar.

Prezența a $10^4 - 10^5$ UFC/ml urină necesită repetarea uroculturii pentru confirmarea sau infirmarea infecției.

Prezența a $< 10^4$ UFC/ml urină semnifică contaminarea probei.

c. Identificarea se face pe baza următoarelor caractere:

- morfotinctoriale: bacili gram-negativi;
- de cultură: colonii mari (2-4 mm Ø), de tip S, rotunde, translucide, cenușii, uneori hemolitice (ex. tulpini de E.coli, Proteus). Bacteriile capsulate formează colonii cu aspect mucos (ex. K.pneumoniae și unele tulpini de E.coli).

Speciile de Proteus dezvoltă pe medii gelozate fără inhibitori (bilă) o cultură cu caracter invaziv: de la locul însămînțării cultura se întinde pe toată suprafața plăcii, sub forma unor valuri concentrice.

Unele tulpini de Serratia formează un pigment roșu;

- biochimice: mediul ABTL pune în evidență caracterul lactozo-pozitiv sau -negativ la 24 ore a tulpinii izolate; încadrarea într-un anumit gen și apoi identificarea ca specie se realizea-

x) ABTL = Agar-Albastru de bromthimol-Lactoză. Mediul are culoare albastră și virează în galben în cazul fermentării lactozei

să pe baza unor teste menționate în tabelul X;

- de patogenitate. Prin teste de patogenitate pot fi identificate unele tulpini de Klebsiella și E.coli. Astfel serotipurile K_1 și K_2 de K.pneumoniae sînt înalt virulente pentru șoarecele alb: inocularea intraperitoneală a 0,1 ml din diluția 10^{-5} a unei culturi de 18 ore în apă peptonată omoară animalul în 24-72 ore cu septicemie; examenul microscopic al amprentelor de splină colorate Gram evidențiază bacili gram-negativi, capsulați, dispuși în perechi.

Inocularea subcutanată a sputei la șoarece constituie o modalitate de izolare și identificare rapidă a K.pneumoniae direct din produs.

In cazul E.coli identificarea prin teste de patogenitate se efectuează în laboratoarele de referință pentru tulpinile enterotoxigene (ex.inocularea în culturi de celule suprarenale de șoarece sau celule ovariene de hamster chinezesc pentru urmărirea efectului citopatogen, testul intragastric pe șoarece sugar etc.) și enteropatogene (testul Sereny);

- antigenice. Identificarea tulpinilor enteropatogene de E.coli se realizează numai serologic: 5 colonii lactozo-pozitive de pe mediul ABTL se aglutinează pe lamă cu ser polivalent anti-E.coli. Dacă reacția este pozitivă se continuă identificarea serotipului printr-o reacție de aglutinare pe lamă cu seruri monovalente și apoi pentru confirmare se completează cu testul de aglutinare în tub. Identificarea se poate efectua și prin metoda imunofluorescentă.

Tulpinile enterotoxigene de E.coli (producătoare de LT) pot fi identificate prin reacții imunologice: testul imunoenzimatic - ELISA, radioimunometria - RIA, testul de imunohemoliză pasivă radială etc.

Tipizarea serologică, ca metodă de identificare, este rar utilizată și pentru alte enterobacteriacee condiționat patogene aparținînd genurilor Citrobacter, Proteus, Providencia, Serratia.

In infecțiile nosocomiale, identitatea tulpinilor izolate de la sursa de infecție și de la bolnavi poate fi dovedită prin stabilirea serotipului, antibiotipului și/sau lizotipului. Pentru speciile din genul Proteus: P.vulgaris și P.mirabilis se poate uti-

liza ca marker epidemiologic fenomenul Dienes: pe o placă cu agar nutritiv se însămînțează în locuri diferite (spoturi) tulpinile de *Proteus* izolate. Dacă tulpinile sînt identice se obțin culturi confluente iar dacă sînt diferite apare o linie de demarcație de 2-3 mm la locul de întîlnire a celor două culturi invadante.

d. Sensibilitatea la antibiotice și chimioterapice. Enterobacteriaceele condiționat patogene sînt natural sensibile la antibiotice cu spectru larg, la polimixine, precum și la sulfamide, cotrimoxazol, acid nalidixic etc. Prezența frecventă a tulpinilor rezistente și multirezistente la medicamente antimicrobiene impune efectuarea antibiogramei la toate izolatele cu semnificație clinică.

Scanned with OKEN Scanner

XIII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CU BACILI GRAM-NEGATIVI AEROBI DIN GENUL PSEUDOMONAS

In genul Pseudomonas se încadrează 2 specii patogene: P.mallei și P.pseudomallei, agenții cauzali ai unor boli cu rezervor animal transmisibile accidental omului: morva, practic eradicată și respectiv melioidoza, boală endemică în sud-estul Asiei. Cu importanță medicală actuală sînt însă unele specii condiționat sau accidental patogene cu habitat în mediul extern (sol, apă, vegetale) care pot coloniza tegumentul, mucoasele și intestinul în special la persoane cu deficiențe ale apărării antiinfecțioase.Dintre acestea, cel mai frecvent implicat în infecții la om este P.aeruginosa (bacilul piocianic).

Pseudomonadaceele sînt bacili gram-negativi, de 1,5-5 μm l/ 0,5-1 μm Ø, drepți sau ușor încurbați, mobili x). Cultivă pe medii simple, în condiții strict aerobe, unele specii fiind producătoare de pigmenți difuzibili în mediu. Nu fermentează zaharurile dar le folosesc prin oxidare xx).

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE P.AERUGINOSA

P.aeruginosa, denumit și bacilul puroiului albastru datorită unui pigment albastru elaborat în puroiul leziunilor deschise (arsuri, plăgi) și în mediile de cultură, ocupă un loc important în patologia infecțioasă, mai ales a mediului de spital xxx) unde existența organismelor tarate, ca și tratamentul intensiv cu antibioti-

---

x) Excepție P.mallei

xx) Testul OF (oxidare-fermentare) diferențiază pseudomonadaceele de enterobacteriaceе (vezi cap.V)

xxx) P.aeruginosa cauzează 10-15% din totalul infecțiilor nosocomiale

ce, mai ales cu spectru larg, permit selectarea de tulpini agresive şi înalt rezistente la antibiotice; pe de altă parte, numeroasele instrumentaţii medicale, exploratorii şi terapeutice, practicate în condiţii de nerespectare a regulilor de asepsie şi antisepsie favorizează însămînţarea acestei bacterii în profunzimea ţesuturilor.

Dintre infecţiile cauzate de P.aeruginosa menţionăm: infecţia plăgilor şi arsurilor, infecţii bronhopulmonare, urinare, gastroenterite holeriforme şi otite mai frecvente la copilul mic, infecţii oculare consecutive folosirii de coliruri contaminate, septicemii, cu localizări secundare meningeale, endocardice, articulare, osoase.

Diagnosticul de laborator în aceste infecţii este exclusiv bacteriologic.

Diagnostic bacteriologic

a. Examenul microscopic efectuat din diferite produse patologice: puroi, l.c.r., urină, spută etc. evidenţiază bacili gramnegativi, de 1,5-3 µm 1/0,5-0,8 µm Ø, dispuşi izolat, mai rar în perechi sau în lanţuri scurte; sînt nesporulaţi şi necapsulaţi (s-au descris variante cu capsulă polizaharidică izolate din infecţii severe).

b. Izolarea se practică pe medii simple: bulion, pentru produsele normal necontaminate (sînge, l.c.r.) şi pe agar nutritiv, prin însămînţare cantitativă, pentru probele contaminate (spută, urină)[x]; în paralel se foloseşte şi un mediu diferenţial cu lactoză şi albastru de bromthimol, ex. ABTL. Incubare 24 ore la 37°C în condiţii de aerobioză.

c. Identificarea ca specie a bacilului piocianic se face pe baza caracterelor de cultură: pe agar nutritiv, coloniile, mai frecvent de tip S, uneori R, sînt mari, convexe, cu reflex metalic; unele tulpini izolate din infecţii respiratorii şi urinare formează colonii mucoide. Bulionul este tulburat cu formarea unei pelicule la suprafaţă. Atît coloniile cît şi mediile lichide au o culoare albastră-verde-fluorescentă datorită elaborării, de către P.aeruginosa,

---

x) Materiile fecale se însămînţează pe mediul selectiv Istrati-Meitert

a 2 pigmenţi difuzibili în mediu: piocianina (pigment albastru caracteristic speciei aeruginosa) şi fluoresceina sau pioverdina (pigment verde fluorescent, produs şi de alte specii ale genului). Culturile degajă un miros aromatic de flori de tei.

Adesea piocianina este mascată de fluoresceină. In acest caz, pentru evidenţierea piocianinei, tulpina se însămînţează într-un tub cu bulion care se incubează la 37°C pînă la apariţia culorii verzi, moment în care se adaugă 2 ml cloroform şi se agită; piocianina fiind solubilă în cloroform, bulionul se colorează în albastru.

Aproximativ 4% din tulpinile de P.aeruginosa nu produc piocianină, situaţie în care diferenţierea de alte specii care elaborează numai fluoresceină: P.fluorescens şi P.putida se face pe baza dezvoltării P.aeruginosa la temperatura de 42°C şi lipsa de dezvoltare la 4°C (comportare inversă la speciile fluorescens şi putida), precum şi pe baza unor caractere biochimice.

Pe agar-sînge coloniile sînt cenuşii, beta-hemolitice.

Pe mediile ABTL şi Istrati-Meitert P.aeruginosa dezvoltă colonii mici, verzi-albăstrui, aderente de mediu.

Identificarea ca specie a bacilului piocianic este în general uşoară. Mai dificilă este însă implicarea etiologică a tulpinii izolate în infecţia respectivă. Pentru a diferenţia P.aeruginosa infectant de cel contaminant se va ţine seama de criteriile menţionate în cap.XII, punctul C: demonstrarea asocierii semnificative a bacililor cu procesul inflamator.

Identitatea tulpinilor de P.aeruginosa izolate din infecţii de spital, mediu spitalicesc şi purtători se stabileşte prin cercetarea a 2 markeri epidemiologici: lizotipul şi serotipul x). In situaţii speciale (ex. evoluţia severă a bolii la un număr mare de persoane) se poate testa şi virulenţa tulpinilor „in vivo" xx).

---

x) Lizotipia şi serotipia sînt determinări de competenţa laboratoarelor de referinţă. La noi în ţară se folosesc schemele propuse de soţii Meitert care cuprind un set de 13 bacteriofagi şi respectiv 22 grupuri serologice

xx) Mai frecvent se foloseşte şoarecele alb care, inoculat pe cale subcutanată cu o cantitate mare de bacterii virulente (10^7-10^8), moare în 1-2 zile cu septicemie

d. Sensibilitatea la antibiotice. P.aeruginosa este o „bacterie problemă" în ceea ce privește tratamentul deoarece numeroase tulpini sînt multirezistente la antibiotice. In consecință, antibiograma este obligatorie pentru oricare izolat cu semnificație clinică. In general, sensibilitatea la antibiotice va fi testată pentru unele peniciline de semisinteză (ex. carbenicilină, ticarcilină, piperacilină, azlocilină), cefalosporine de semisinteză (în special cefsulodin și ceftazidim), aminoglicozide (ex.gentamicină, tobramicină, amikacină, sisomicină) și polimixine. In același timp se vor urmări nivelurile antimicrobiene atinse în umori de antibioticele cu care se face tratamentul.

Scanned with OKEN Scanner

XIV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL UNOR INFECTII CAUZATE DE BACILI GRAM-POZITIVI NESPORULATI

In raport cu necesitățile în oxigen pentru dezvoltare, bacilii gram-pozitivi nesporulați pot fi clasificați în 3 categorii:

- aerobi și facultativ anaerobi, ex. genurile Corynebacterium, Rothia [x];
- microaerofili, ex. genurile Lactobacillus, Arachnia;
- anaerobi, ex. genul Actinomyces.

Genul Corynebacterium grupează bacili gram-pozitivi ușor încurbați, cu structură granulară și extremități frecvent măciucate, dispuși în litere unghiulare sau în palisade, imobili, necapsulați. In acest gen se încadrează C.diphtheriae, specie patogenă pentru om, precum și unele specii patogene pentru animale: C.pseudotuberculosis, C.ulcerans, C.renale etc. De asemeni mai fac parte unele specii comensale ale tegumentului și mucoaselor tractusului respirator și conjunctivei, reunite sub numele de „difterimorfi": C.pseudodiphtheriticum și C.xerosis, asemănătoare morfologic cu C.diphtheriae de care trebuie diferențiate; în general nepatogene, ele pot determina ocazional endocardite sau pneumonii la persoane imunodeprimate. Mai recent a fost inclusă în genul Corynebacterium, C.matruchotii, comensal al cavității bucale la om, constituient al plăcii dentare.

Genul Lactobacillus cuprinde bacili gram-pozitivi, de obicei drepți, lungi și subțiri, cu extremități rotunjite, dispuși izolat, în perechi sau în lanțuri scurte, imobili, necapsulați.

Genul Actinomyces include bacterii gram-pozitive filamentoase, ramificate, imobile. Sînt stimulate în creștere de CO_2.

Genul Arachnia include bacterii cu morfologie asemănătoare

---

[x] Genul Rothia include o singură specie, R.dentocariosa, prezentă în placa dentară supragingivală la om

actinomicetelor de care se diferențiază biochimic. Nu necesită CO_2 pentru dezvoltare.

A. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIFTERIEI

Difteria este o toxiinfecție acută transmisibilă. La noi în țară, ca urmare a generalizării vaccinării antidifterice a copiilor, ea și-a pierdut aspectul epidemic, îmbolnăvirile avînd în prezent un caracter sporadic.

Agentul etiologic al difteriei este C.diphtheriae, bacterie care se multiplică la poarta de intrare reprezentată de o mucoasă (cel mai frecvent faringiană), mai rar de o plagă, unde rămîne cantonată și elaborează exotoxina [x] care difuzează în organism pe cale sangvină.

Local, datorită absorbției toxinei, se produc leziuni congestive și necrotice acoperite cu un exsudat fibrinos, infiltrat cu polimorfonucleare și hematii, „falsa membrană"; aceasta se prezintă ca un depozit cenușiu, aderent, care se detașează cu greutate lăsînd o suprafață sîngerîndă.

Toxina, pătrunsă în organism, se fixează preferențial la nivelul miocardului, rinichilor, glandelor suprarenale și sistemului nervos periferic.

Rareori, difteria poate fi cauzată de tulpini de C.ulcerans Di tox^+, adică producătoare de toxină difterică ca urmare a lizogenizării lor de către un fag difteric tox^+.

Diagnostic bacteriologic

Deși tratamentul specific în difterie are caracter de urgență, fiind instituit pe baza argumentelor de ordin clinic, examenul bacteriologic este acela care aduce proba decisivă a etiologiei difterice a infecției prin evidențierea bacilului difteric toxigen în leziunile de la poarta de intrare.

a. Recoltarea produselor patologice. La bolnavul cu angină difterică se recoltează 3 tampoane din falsa membrană de pe amigdale (prin ștergerea viguroasă a acesteia pentru a obține detașarea unei mici porțiuni) și un tampon cu exsudat nazal.

b. Examenul microscopic. Cu tamponul 1, recoltat de la nivelul faringelui, se efectuează un frotiu colorat Gram care informea-

---

[x] Sînt toxigene numai tulpinile de C.diphtheriae purtătoare a unui bacteriofag temperat care deține gena tox^+

ză asupra prezenţei unor bacili coryneformi. In acelaşi timp, el permite excluderea etiologiei fusospirochetice, asociaţie bacteriană întîlnită în angina Vincent care poate evolua cu semne locale asemănătoare anginei difterice.

c. Izolarea bacilului difteric se face prin însămînţarea tamponului 2 pe mediile Tinsdale (geloză-ser-cistină-telurit de K-thiosulfat de Na) şi agar-sînge, repartizate în plăci Petri. Tamponul 3 se introduce într-un mediu lichid de îmbogăţire, OST (ou-ser-telurit).

Tamponul cu exsudat nasal se scufundă în mediul OST.

După incubare 24 ore la 37°C se face citirea culturilor:

- prezenţa coloniilor negre cu halou brun pe mediul Tinsdale sînt suspecte pentru C.diphtheriae; efectuarea unui frotiu din colonii este însă obligatorie pentru a elimina confuzia cu unele specii de stafilococ.

Coloniile negre cu halou de pe mediul Tinsdale vor fi repicate pe mediul Loeffler (bulion glucozat 1% cu ser de bou, solidificat prin coagulare la baia de nisip) pentru a obţine cultura stock care va servi la identificare. In absenţa coloniilor suspecte pe mediul Tinsdale, tamponul 3, îmbogăţit în mediul OST, se descarcă pe o altă placă Petri cu mediul Tinsdale.

Tamponul cu exsudat nasal din mediul OST se însămînţează de asemeni pe mediul Tinsdale;

- cultura pe agar-sînge aduce informaţii asupra prezenţei eventuale în produs a Str.pyogenes. C.diphtheriae cultivă pe acest mediu sub formă de colonii alb-gris perle.

d. Identificarea. Din cultura de pe mediul Loeffler, granulară în cazul C.diphtheriae şi cremoasă în cazul C.ulcerans şi difterimorfilor, se realizează în continuare o serie de examene pentru identificarea microbului:

- morfotinctorial. Se efectuează 2 frotiuri: unul colorat Gram şi altul colorat după metoda del Vecchio (cu albastru de metilen alcalin) pentru o mai bună evidenţiere a corpusculilor metacromatici.

In frotiul colorat Gram, C.diphtheriae apare sub formă de bacili de 2-8 µm 1/0,5-0,8 µm ∅, uşor încurbaţi, măciucaţi, dispuşi în unghiuri ascuţite (V,L,Y) sau în „litere chinezeşti", gram-pozi-

tivi la limită; prezintă corpusculii Babeş-Ernst care în coloraţia del Vecchio sînt coloraţi în brun-verzui iar corpul microbian în galben (tabelul XIII).

C.ulcerans se prezintă sub formă de cocobacili granulaţi, gram-pozitivi la limită.

Difterimorfii sînt negranulaţi, gram-pozitivi intens. Pot avea un aspect de „boabe de orez" sau suveică, dispuşi în palisade: C.pseudodiphtheriticum sau pot fi bacili neomogen coloraţi, cu „aspect tigrat": C.xerosis (vezi tabelul XIII);

- cultural. Pe mediul Tinsdale, coloniile sînt negre cu halou brun cafeniu x) pentru speciile C.diphtheriae şi C.ulcerans şi fără halou pentru difterimorfi.

C.diphtheriae are 3 variante: gravis, mitis şi intermedius, a căror denumire nu reflectă diferenţe în severitatea îmbolnăvirilor dar prezintă caractere de cultură şi biochimice bine definite. Astfel, pe mediul Gundel-Tietz (geloză-sînge-cistină-telurit de K) gravis desvoltă colonii plate, de 1-2 mm, cu striuri radiare, suprafaţa granulară şi margini crenelate - „aspect de margaretă". Coloniile sînt negre-cenuşii şi au o consistenţă friabilă; mitis formează colonii convexe, circulare, cu suprafaţa lucioasă şi consistenţă cremoasă; intermedius cultivă sub formă de colonii mici, plate, circulare, cu suprafaţa granulară, semicremoase;

- biochimic. C.diphtheriae poate fi identificat rapid ca specie printr-o reacţie de aglutinare pe lamă cu ser aglutinant polivalent antidifteric;

- de toxinogeneză. Testarea capacităţii toxinogene a unei tulpini de C.diphtheriae izolată este obligatorie. Ea se efectuează în mod curent prin testul de imunodifuzie în gel Elek-Ouchterlony-Frobisher (vezi cap.V). Testul este pozitiv şi pentru tulpinile de C.ulcerans Di tox^{+}.

Evidenţierea toxinei se mai poate face prin teste „in vivo" (inocularea culturii în bulion sau a filtratului de cultură subcu-

---

x) Cistina din mediu este hidrolizată de cistinază elaborată de cele 2 bacterii iar H_2S rezultat reacţionează cu sărurile de telur producînd un halou brun-cafeniu în jurul coloniilor

Tabelul XIII SCHEMA DE IDENTIFICARE A SPECIILOR C. diphtheriae și C. ulcerans

	Morfologie microscopică Frotiu Gram de pe m. Loeffler	Caractere de cultură: Tinsdale x)	Caractere de cultură: Loeffler	Fermentarea zaharurilor: G x)	Z x)	D xx)	Gli xx)	Teste enzimatice: Cistinază (H_2S)	Teste enzimatice: Urează	Toxinogeneza „in vitro" (Testul E.O.F.)	
C. diphtheriae	Bacili dispuși în litere unghiulare, măciucați, cu corpusculi Babes-Ernst Gram+ la limită	colonii negre, cu halou brun	Cultură granulară	++	–	++	++	++	–	+	Gravis
				++	–	++	–	++	–	+	Mitis sau intermedius
Coryneformi	Bacili inegal colorați (tigrați) Gram + intens	Colonii negre, fără halou	Cultură cremoasă	++	++	–	–	–	(–) +	–	C. xerosis
	Bacili în „bob de orez" dispuși în palisade Gram + intens			–	–	–	–	–	+ (–)	–	C. pseudodiphtheriticum
C. ulcerans Di. tox+	Cocobacili Gram + la limită	Colonii negre, cu halou brun	Cultură cremoasă, lucioasă	++	–	++	V	++	++	+	

X)= Caractere pentru diferențierea de SPECIE; XX)= Caractere pentru diferențierea de TIP

V)= Comportare variabilă a tulpinilor

Scanned with OKEN Scanner

tanat la cobai sau intradermic la iepure [x]) sau în culturi celulare, în special de rinichi de maimuță (se urmărește efectul citopatogen tradus prin desprinderea celulelor de pe peretele tubului).

e. Sensibilitatea la antibiotice. Bacilul difteric este sensibil la o gamă largă de antibiotice, cele mai active fiind penicilina și eritromicina.

B. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ENDOCARDITEI CU LACTOBACILI

Lactobacilii se găsesc în mediul extern în produse lactate, fructe și sucuri de fructe, apă, bere, vin etc.; de asemenea unele specii, ca L.acidophilus, L.casei, L.plantarum, L.salivarius, fac parte din microbiota rezidentă a cavității bucale, intestinului și vaginului la om.

Bacteriile din genul Lactobacillus au 2 proprietăți importante: sînt acidogene (produc mari cantități de acizi prin fermentarea zaharurilor) și acidurice (rezistă la un mare grad de aciditate, fatal pentru alți microbi nesporulați). Cunoașterea acestor 2 atribute explică capacitatea acestor bacterii de a se dezvolta în condiții de pH scăzut (în jur de 5), precum și rolul important al lactobacililor din cavitatea bucală în generarea cariei dentare.

Singurul rol patogen acceptat pentru lactobacili pînă în ultimii ani a fost acela de inițiator, alături de streptococii bucali, al cariei dentare. Ulterior au fost semnalate cazuri rare de endocardită subacută cu acești microbi, survenite în special după tratamente stomatologice, la persoane cu cardiopatii congenitale sau dobîndite. Dintre speciile de lactobacili izolate, pe primul loc s-a situat L.casei, subsp.rhamnosus, urmat de L.acidophilus și L.plantarum; ocazional a fost izolat L.salivarius. Numărul redus de cazuri de endocardită cu lactobacili descrise în literatură s-ar putea să nu exprime frecvența reală a implicării lor etiologice în aceste infecții, datorită pe de o parte dificultăților de izolare

---

[x]) Cobaiul, inoculat subcutanat, moare în 24-72 ore cu semne de intoxicație difterică: edem gelatinos la locul de inoculare, congestia și hipertrofia capsulelor suprarenale, lichid în seroase (pleură, peritoneu). Animalul martor, protejat cu ser antidifteric, nu prezintă nici un simptom.

Iepurele, inoculat intradermic, prezintă la 24-48 ore un eritem însoțit uneori de necroză caracteristică (cocardă), fenomen care poate fi prevenit prin administrare prealabilă de ser antidifteric

(condiţii speciale de cultivare) iar pe de altă parte considerării lactobacililor ca simpli agenţi contaminanţi. De aceea se sugerează ca în prezenţa unor hemoculturi în mod repetat negative să se încerce cultivarea şi în condiţiile cerute de lactobacili.

Diagnostic bacteriologic

Diagnosticul de laborator în endocardită este exclusiv bacteriologic.

a. Izolarea lactobacililor se practică prin hemoculturi efectuate pe medii lichide bogate în principii nutritive, cu pH acid (5,5-6). Se recomandă mediul MRS lichid x) sau bulionul tripticază-soia. Culturile vor fi incubate în anaerobioză sau în atmosferă cu 5-10% CO_2. In cazul unei hemoculturi pozitive, după 24-48 ore de termostazie apare o tulburare intensă a mediului.

b. Identificarea lactobacililor izolaţi în hemocultură se va face pe baza unui complex de caractere: morfotinctoriale, de cultură, biochimice şi eventual antigenice.

Fig.56 L.acidophilus
Frotiu din cultură

i. Caractere morfotinctoriale: în frotiul colorat Gram se observă bacili gram-pozitivi, drepţi, cu capete rotunjite, de 1,5-6/um 1/0,6-0,9/um Ø, dispuşi izolat, în perechi sau în lanţuri de lungime variabilă (fig.56).

ii. Caractere de cultură. Din hemocultură se vor face treceri pe medii solide cu pH acid: mediul MRS solid, agar-tripticază-soia sau agar cu suc de tomate; după 24-48 ore de incubare la termostat apar colonii de 1-2 mm Ø, R sau S, cel mai adesea nepigmentate. Pentru diferenţierea speciilor se poate cerceta dezvoltarea tulpinii izolată la 15°C şi 45°C.

iii. Caractere biochimice. Cel mai important caracter este fermentarea zaharurilor care permite diferenţierea speciilor (ta-

---

x) Mediul MRS (Man-Rogosa-Sharpe) este un bulion îmbogăţit cu extract de drojdie, glucoză, soluţie de săruri ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ şi $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$, în apă distilată), acetat de sodiu, K_2HPO_4, citrat triamonic şi Tween 80. Mediul poate fi solidificat prin adaos de agar 20‰

belul XIV).

Tabelul XIV. Unele caractere de diferențiere a lactobacililor izolați din cazuri de endocardită subacută.

Specia de lactobacili	Dezvoltarea la: 15°C	45°C	Fermentarea unor zaharuri: Manitol	Manoză	Rafinoză	Ramnoză	Grup serologic
L.casei, subspecia rhamnosus	+	+	+	+	-	+	C
L.acidophilus	-	+	-	+	d	-	negrupabil
L.plantarum	+	-	+	+	+	-	D
L.salivarius	-	+	+	-	+	d	G

d=comportare diferită a tulpinilor

iv. Caractere antigenice. Pe baza unor antigene polizaharidice de grup unii lactobacili au fost clasificați în 7 grupuri serologice (A-G), a căror identificare se face printr-o reacție de precipitare tip Lancefield (vezi tabelul XIV).

e. Sensibilitatea la antibiotice. Lactobacilii sînt în mod obișnuit sensibili la penicilină G, macrolide, precum și la unele antibiotice cu spectru larg: ampicilină, aminoglicozide, tetracicline etc., dar efectuarea antibiogramei se impune la orice tulpină infectantă izolată. In general, în tratamentul endocarditei s-au obținut bune rezultate cu asociația sinergică: penicilină - streptomicină sau ampicilină-gentamicină.

C. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ACTINOMICOZEI CERVICO-FACIALE

Actinomicoza cervico-facială este o boală supurativă cu evoluție subacută sau cronică, cauzată de bacterii anaerobe sau microaerofile din genurile Actinomyces și Arachnia.

Actinomicoza umană este produsă de obicei de A.israelii și numai ocazional de A.naeslundii sau Ar.propionica. Aceste specii nu se găsesc în stare liberă în natură, ci sînt comensali stricți ai cavității bucale făcînd parte din microbiota indigenă a acesteia la aproximativ 5-8% din persoanele sănătoase; actinomicetele au fost evidențiate în placa dentară, canale radiculare infectate,

pungi parodontale[x]).

Apariţia infecţiei este condiţionată de existenţa unei porţi de intrare, traumatică (fracturi de maxilare, extracţii, erupţii sau luxaţii dentare etc.) sau infecţioasă (pericoronarite, parodontite apicale, parodontite marginale cronice etc.) care permite pătrunderea actinomicetelor în profunzimea ţesuturilor.

Actinomicoza cervico-facială [xx]) este o infecţie de origine endogenă care debutează clinic printr-o infiltraţie a ţesutului celular subcutanat, în special în regiunea subangulomandibulară [xxx]), însoţită uneori de trismus. Tumefierea nedureroasă dă la palpare senzaţia de duritate lemnoasă. Caracteristică este absenţa adenopatiei regionale. Treptat, pielea devine roş-violacee şi boselată datorită constituirii unor abcese subcutanate care, în absenţa tratamentului, se deschid prin multiple fistule (aspect de „stropitoare") eliminînd un puroi nelegat, grunjos, cu mici granule alb-gălbui, de aproximativ 0,5-1 mm Ø şi consistenţă dură - „granule de sulf", care reprezintă colonii de Actinomyces. După fistulizare, leziunea se suprainfectează adesea cu coci piogeni.

Actinomicoza evoluează în pusee succesive, de aceea leziunile coexistă în diferite stadii evolutive: în timp ce unele fistule se închid, cu formare de cicatrici, alte abcese se constituie şi noi traiecte fistuloase se deschid.

Actinomicoza este cel mai adesea o infecţie localizată dar sînt posibile şi generalizări pe cale sangvină, într-o fază mai avansată a bolii, cu localizări secundare metastatice în pulmoni, rinichi, creier.

Diagnostic bacteriologic

Diagnosticul de laborator în actinomicoză se face exclusiv

---

x) In genul Actinomyces se încadrează şi alte specii prezente în cavitatea bucală a omului, ex. A.odontolyticus, A.viscosus, dar care n-au fost implicate în generarea actinomicozei. Specia tip a genului, A.bovis, este agentul cauzal al actinomicozei bovine

xx) Formele clinice de actinomicoză sînt în ordinea frecvenţei: cervico-facială (cca 60% din cazuri), abdominală (aproximativ 30% din cazuri) şi toracică

xxx) Sînt citate cazuri rare de actinomicoză linguală, gingivală, labială, a glandelor salivare şi foarte rar osoasă (în special a mandibulei)

prin metode bacteriologice (izolarea şi identificarea microbului), folosind ca produs patologic puroiul sau produsul de puncţie biopsică.

Prelevarea puroiului se va face de preferinţă din leziunile ramolite dar închise, neinfectate secundar, cu ajutorul unei seringi sau în timpul deschiderii chirurgicale a abceselor. Pentru a mări şansele de evidenţiere a granulelor din traiectul fistulos, în cazul intervenţiei chirurgicale, după prima recoltare a puroiului, plaga operatorie va fi acoperită cu un compres steril din tifon care va fi menţinut pînă a doua zi şi apoi trimis la laborator pentru examen bacteriologic.

a. <u>Examenul microscopic</u>. Puroiul va fi etalat într-o cutie Petri sterilă pentru a observa (cu ochiul liber sau cu lupa) granulele caracteristice; acestea vor fi prelevate, strivite între două lame de sticlă, iar frotiurile obţinute vor fi colorate Gram şi eventual Ziehl-Neelsen.

La examenul microscopic al frotiului colorat Gram, granulele apar constituite din 2 zone: una centrală formată din filamente subţiri (aproximativ 1 µm Ø), gram-pozitive, care se întreţes ca o pîslă densă şi alta periferică reprezentată de terminaţiile miceliene ramificate, cu aspecte măciucate, dispuse radiar. Granula actinomicetică este înconjurată de o coroană de elemente piriforme, de natură lipidică, gram-negative, care reprezintă reacţia organismului la invazia microbiană.

In frotiul colorat Ziehl-Neelsen, actinomicetele apar neacidoalcoolorezistente iar coroana de elemente lipidice roşie.

Examenul microscopic direct are valoare diagnostică în cazurile de actinomicoză tipică din punct de vedere clinic. In absenţa simptomelor caracteristice este necesară izolarea actinomicetului pe medii de cultură.

b. <u>Izolarea</u>. Ca <u>inoculum</u> se folosesc granulele spălate, de cîteva ori, pentru decontaminare, în soluţie salină izotonă. După ultima spălare şi concentrare printr-o centrifugare la turaţie mică, granulele din sediment se strivesc în tubul de centrifugă cu o baghetă din sticlă sterilă, într-o mică cantitate de soluţie salină izotonă iar suspensia obţinută va servi la însămînţare.

Izolarea se practică pe agar-infuzie-cord-creier sau agar-tripticază-soia suplimentate cu 5% sînge de iepure, oaie sau cal.

Există şi medii complexe semisintetice (ex. mediul CC) care conţin săruri minerale, vitamine şi aminoacizi. Incubarea se va face în condiţii de anaerobioză şi în atmosferă cu 5-10% CO_2 care stimulează creşterea, la temperatura de 35-37°C, timp de 2 săptămîni.

După 2-3 zile de termostazie se vor examina microcoloniile cu lupa sau la microscop (cu mărire 100x); coloniile sînt filamentoase cu aspect de „păianjen", adică sînt formate din numeroase filamente originare dintr-un singur punct central şi dispuse radiar. La 7-14 zile de incubaţie se vor observa microcoloniile care sînt de tip R, alb-cenuşii, de 0,5-2 mm Ø, convexe, lobate, cu aspect de „dinte molar" sau „zmeură", nehemolitice.

Fig.57 A.israelii
Frotiu din cultură

Coloniile de A.naeslundii pot fi de tip R, asemănătoare celor de A.israelii, sau de tip S.

Examenul microscopic al culturii evidenţiază bacterii filamentoase: foarte lungi (10-50 µm sau mai mult) şi subţiri (0,2-1 mm Ø), ramificate, gram-pozitive; filamentele pot fi continui sau fragmentate în elemente bacilare, asemănătoare corynebacteriilor (fig.57).

c. Identificarea speciilor de actinomicete implicate în actinomicoza cervico-facială este dificilă; ele nu pot fi diferenţiate pe criterii morfologice şi de cultură, ci numai pe baza unor caractere biochimice (tabelul XV), precum şi serologic, utilizînd diferite tehnici, în special imunofluorescenţa.

A.israelii şi A.naeslundii aparţin la serogrupuri diferite: D şi respectiv A şi au fiecare cel puţin 2 variante serologice. Ar.propionica are de asemeni 2 serotipuri şi nu prezintă reacţii încrucişate cu nici una din speciile genului Actinomyces.

d. Sensibilitatea la antibiotice. A.israelii şi Ar.propionica sînt sensibile la o gamă largă de antibiotice active asupra bacteriilor gram-pozitive şi cu spectru larg[x)] dar antibioticul de

---

[x)] Actinomicetele sînt rezistente la oligozaharide, polimixine şi metronidazol

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XV. Unele caractere biochimice diferențiale între A.israelii, A.naeslundii și Ar.propionica

Reacția biochimică		A.israelii	A.naeslundii	Ar.propionica
Fermentarea zaharurilor	Glucoză	+	+	+ x)
	Arabinoză	+	−	−
	Manitol	v	−	+
	Ramnoză	v	−	−
	Xiloză	+	v	−
Hidroliza esculinei		+	+	−
Producere de amoniac din arginină		+	v	−

x) A.israelii și A.naeslundii fermentează glucoza fără producere de acid propionic iar Ar.propionica cu formarea acestui acid

v = comportare variabilă a tulpinilor

elecție în tratamentul actinomicozei este penicilina G înlocuită, în caz de sensibilizare, cu tetraciclinele. In actinomicoza osoasă este indicată lincomicina.

XV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE BACILI GRAM-POZITIVI SPORULATI

Bacilii gram-pozitivi sporulaţi sînt larg răspîndiţi în natură, în special în sol (bacterii telurice); de asemenea unii habitează colonul omului şi animalelor. Ei sînt incluşi în 2 genuri:

- genul Bacillus care reuneşte bacili mari, cu capete retezate, dispuşi în lanţuri, gram-pozitivi; posedă un spor ovalar, situat central, care nu deformează corpul bacterian. Sînt aerobi sau facultativ anaerobi.

In genul Bacillus se încadrează B.anthracis, specie patogenă pentru om şi animale la care determină antraxul sau cărbunele, precum şi unele specii, cunoscute sub numele de „antracoizi", majoritatea saprofite şi cîteva accidental patogene. Astfel B.cereus, cel mai strîns înrudit cu B.anthracis dintre toate speciile genului, poate cauza intoxicaţii alimentare cu sindrom holeriform consecutiv consumului de alimente în care bacteria s-a înmulţit elaborînd enterotoxine; uneori poate produce bacteriemii cu localizări secundare meningeale şi pulmonare. B.subtilis a fost implicat în infecţii oculare (conjunctivite, iridociclite, panoftalmii) ca urmare a folosirii colirurilor contaminate cu această bacterie;

- genul Clostridium care cuprinde bacili gram-pozitivi, necapsulaţi şi mobili (face excepţie Cl.perfringens care este capsulat şi imobil), cu spor sferic sau ovalar a cărui diametru transversal depăşeşte pe acela al corpului bacilar. Sînt anaerobi.

Cele mai multe specii din genul Clostridium sînt saprofite şi numai cîteva patogene din care reţinem: Cl.perfringens, responsabil de o gamă largă de infecţii, majoritatea cu caracter gangrenos, Cl.tetani, agentul cauzal al tetanosului şi Cl.botulinum, agentul etiologic al botulismului.

Scanned with OKEN Scanner

A. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ANTRAXULUI

Antraxul sau cărbunele este o zooantroponoză, rezervorul animal fiind reprezentat în special de erbivorele domestice (bovine, ovine, caprine, cabaline) la care infecţia evoluează septicemic. Imbolnăvirile la om îmbracă îndeosebi un caracter profesional (îngrijitori de animale, veterinari, măcelari, blănari, tăbăcari etc.), contaminarea avînd loc prin contactul cu animalele bolnave sau cu produsele lor (lînă, blănuri, piei, păr, carne, etc.).

In raport cu calea de pătrundere a B. anthracis în organism, se descriu 3 forme clinice de antrax: cutanată, pulmonară şi digestivă.

Antraxul cutanat sau pustula malignă, forma cea mai frecventă, se localizează în special la faţă, ceafă, mînă sau antebraţ [x]. Local apare o maculă care evoluează într-o veziculă cu conţinut sero-sangvinolent, pe un fond de edem gelatinos, nedureros. Progresiv, leziunea devine necrotică, prezentînd în centru o escară neagră în jurul căreia apar vezicule satelite. Ganglionii limfatici regionali (submandibulari, cervicali, axilari) sînt tumefiaţi şi dureroşi.

Antraxul pulmonar apare la lucrătorii din industria lînei ca urmare a inhalării sporilor de B. anthracis. Evoluează ca o pneumonie însoţită de o mediastinită acută hemoragică foarte severă.

Antraxul digestiv este rar întîlnit la persoane care au consumat carne infectată, insuficient prelucrată termic. Evoluează ca o enterocolită gravă.

Toate formele clinice de antrax pot determina generalizare septicemică şi secundar meningoencefalită, frecvent letală.

Diagnosticul de laborator în infecţia cărbunoasă este exclusiv bacteriologic.

Diagnostic bacteriologic

Produsele examinate variază în funcţie de forma clinică a infecţiei, ele fiind reprezentate de exsudat vezicular sau lichid de edem, sînge, l.c.r., spută sau materii fecale.

---

[x] In literatură sînt citate cazuri de cărbune bucal, consecutiv folosirii periuţei de dinţi confecţionată din păr contaminat

a. Examenul microscopic. Pe frotiul colorat Gram se observă bacili lungi şi groşi, de 4-10 um 1/1-1,5 um Ø, cu capete tăiate drept, gram-pozitivi, dispuşi în perechi sau în lanţuri scurte, înconjuraţi de o zonă clară - capsula; cu albastru de metilen policrom capsula se colorează metacromatic în roz. Microbii sînt nesporulaţi (fig.58, a). Această morfologie caracteristică permite un diagnostic prezumtiv rapid în cazul probelor necontaminate.

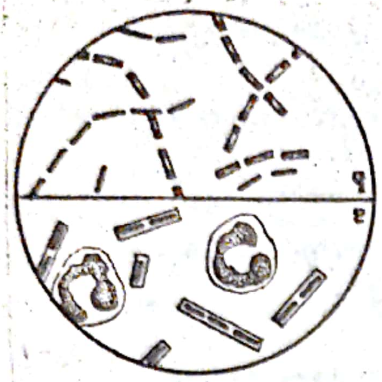


Fig.58 B.anthracis
a. Frotiu din produs
b. Frotiu din cultură

In oricare produs, B.anthracis poate fi decelat rapid prin metoda imunofluorescentă, folosind un ser fluorescent anticapsular.

b. Izolarea. Produsele necontaminate vor fi însămînţate pe agar-sînge de oaie, agar nutritiv sau în bulion (hemocultura). Probele intens contaminate (materii fecale, spută) vor fi însămînţate pe medii solide după încălzire prealabilă 10 minute la 75°C pentru distrugerea bacteriilor nesporulate de contaminare. Incubare aerobă.

c. Identificarea. B.anthracis va fi identificat pe baza următoarelor caractere:

- morfotinctoriale. In frotiurile practicate din culturi efectuate pe agar nutritiv şi incubate aerob, bacilii se dispun în lanţuri lungi (aspect de „beţe de bambus") şi prezintă spori centrali, ovalari, care nu deformează corpul microbian (fig.58, b). Sînt necapsulaţi (capsula apare numai în culturi pe medii cu ser sau bicarbonat de sodiu);

- de cultură. Pe agar nutritiv, B.anthracis dezvoltă colonii mari (2-4 mm Ø), plate, uscate, rugoase, cu margini dendritice (tip R); marginile coloniei examinate la microscop apar ca şuviţe lungi de păr formate din lanţuri paralele de bacili, ceea ce conferă coloniei un aspect caracteristic de „cap de Meduză".

Pe agar-sînge, coloniile de B.anthracis, asemănătoare celor de pe agar nutritiv, sînt nehemolitice [x] (caracter diferenţial

---

[x] Unele tulpini pot produce însă după 24 ore o zonă discretă de beta-hemoliză

Scanned with OKEN Scanner

față de antracoizi).

Pe medii solide cu ser sau 5-7% bicarbonat de sodiu, în atmosferă cu 10-25% CO_2, B.anthracis dezvoltă colonii mucoide constituite din bacili încapsulați.

In bulion, B.anthracis formează un depozit floconos, mediul rămînînd limpede.

In medii sintetice, cum este mediul „PLET" (Polimixină, Lizozim, EDTA x), Acetat de thaliu), B.anthracis formează în 24 ore colonii mici iar B.cereus nu crește (tabelul XVI):

Tabelul XVI. Unele criterii de diferențiere între B.anthracis și B.cereus

Criterii	B.anthracis	B.cereus
Mobilitate	-	+
Capsulă	+	-
Beta-hemoliză pe agar-sînge în 24 ore	-	+
Colorare cu ser imun fluorescent anticapsular	+	-
Creșterea pe mediul PLET	+	-
Testul Jensen-Kleemeyer	+	-
Sensibilitate la fagul „gamma"	+	-
Patogenitate pentru cobai și șoareci	+	-

- antigenice: B.anthracis se colorează cu ser imun fluorescent anticapsular;
- de patogenitate. Soarecii inoculați intraperitoneal fac o septicemie mortală în 2-3 zile. In frotiurile din sînge și splină pot fi evidențiați bacili încapsulați. Antracoizii nu sînt patogeni în aceste condiții (vezi tabelul XVI).

Pentru diferențierea de antracoizi, și în special de B.cere-

x) Etilendiaminotetraacetat de sodiu

Scanned with OKEN Scanner

us, se mai poate studia sensibilitatea tulpinii izolate la fagul „gamma" şi comportarea acesteia în testul Jensen-Kleemayer („testul şiragului de perle"): B.anthracis cultivat pe agar nutritiv cu 0,05-0,5 U penicilină/ml prezintă în frotiu, după o incubare de 2 1/2-3 ore, aspectul unui lanţ constituit din forme globuloase.

d. Sensibilitatea la antibiotice. B.anthracis este sensibil la multe antibiotice. Penicilina este antibioticul de elecţie în tratamentul antraxului; în caz de sensibilizare la penicilină se va recurge la eritromicină sau tetracicline. B.cereus este rezistent la penicilină.

e. Diagnosticul retrospectiv al infecţiei cărbunoase se stabileşte cu ajutorul reacţiei de termoprecipitare Ascoli care decelează antigenul polizaharidic somatic al bacilului cărbunos chiar la cadavre intrate în putrefacţie. Reacţia se bazează pe principiul că extractul apos, la cald, preparat din diferite organe (splină, ficat etc.), prelevate de la cadavru, dă o reacţie de precipitare inelară pozitivă în prezenţa serului anticărbunos.

B.DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE CL.PERFRINGENS

Cl.perfringens este larg răspîndit în natură (sol, apă, aer, alimente) şi în acelaşi timp un constituient al microbiotei indigene a organismului uman (prezent constant în colon, frecvent pe piele, în vagin la cca 5% din femeile normale, în cavitatea bucală).

Au fost diferenţiate 5 serotipuri de Cl.perfringens: A-E, care elaborează numeroase toxine şi enzime, tipul A fiind în special implicat în infecţii la om.

Sporii de Cl.perfringens contaminează frecvent plăgile traumatice, putînd cauza celulite, fasciite, iar în caz de plăgi profunde, cu zone de ischemie, infecţie mixtă cu bacterii aerobe şi distrugeri importante musculare, gangrena gazoasă (G.G.) x), toxiinfecţie invazivă la a cărei producere mai concură 2 specii de clostridii histotoxice: Cl.novyi şi Cl.septicum.

---

x) G.G. debutează la 1-3 zile după traumatism cu durere locală intensă (datorită distensiei ţesuturilor prin edem gazos şi mionecrozei), crepitaţii la palpare, serozitate sero-sangvinolentă cu miros fetid, febră, hemoliză, stare toxică; netratată precoce evoluează rapid spre exitus

Cl.perfringens mai poate determina infecţii uterine post-abortum şi bacteriemii însoţite adesea de hemoliză intravasculară, enterite necrozante (cauzate de serotipul C), angine gangrenoase, stomatite ulceroase, toxiinfecţii alimentare (după consumul de alimente contaminate cu tulpini de Cl.perfringens producătoare de enterotoxină; enterotoxina este elaborată în intestin în momentul sporulării bacililor). Este frecvent asociat în infecţii gangrenoase ale pulpei dentare.

Diagnosticul de laborator al infecţiilor cauzate de Cl.perfringens este exclusiv bacteriologic.

Diagnostic bacteriologic

a. Examenul microscopic direct. In infecţiile de tip gangrenos, frotiul colorat Gram din produse patologice (serozitate sau puroi din profunzimea plăgilor, secreţii uterine, ţesut recoltat intraoperator etc.), evidenţiază bacili groşi (0,8-1,2 µm Ø), de lungime variabilă (3-9 µm), cu extremităţi rotunjite, gram-pozitivi, capsulaţi. Sporulează foarte rar, sporii fiind ovalari şi dispuşi subterminal sau central; ei deformează bacilul care ia aspect caracteristic de „rachetă de tenis" şi respectiv de „bărcuţă".

b. Izolarea se practică prin însămînţarea produselor în condiţii de anaerobioză pe agar-sînge făcut selectiv prin adaos de antibiotice (streptomicină 25 µg/ml, neomicină 25 µg/ml şi polimixină 100 U/ml). Coloniile sînt mari (2-5 mm Ø), rotunde, cenuşii, translucide, hemolitice (o zonă îngustă de hemoliză completă, înconjurată de o a doua zonă de hemoliză incompletă).

Produsele pot fi însămînţate şi direct pe mediul Nagler (agar glucozat cu gălbenuş de ou), după îndepărtarea prealabilă a florei de asociaţie prin trecerea lor într-un mediu lichid cu amestec selectiv de antibiotice. După 24-48 ore de incubare la 37°C se constată opacifierea mediului în jurul coloniilor datorită elaborării unei exoenzime, lecitinaza (sau alfa-toxina) care descompune lecitovitelina din ou. Dacă o jumătate a plăcii se acoperă cu ser antitoxic antiperfringens şi însămînţarea se face în striuri perpendiculare pe linia de separare a celor două jumătăţi ale plăcii, opacifierea apare numai în jumătatea plăcii fără ser (în jumătatea cu ser lecitinaza a fost neutralizată).

Coloniile de pe agar-sînge vor fi verificate microscopic iar

cele producătoare de lecitinază vor fi însămînțate în lapte turnesolat pe care Cl.perfringens îl virează în roșu, ca urmare a fermentării lactozei, și îl coagulează cu producerea unui cheag buretos - cheag alveolar și separarea zerului (această reacție nu este întîlnită la nici un alt anaerob care elaborează lecitinază).

c. Identificarea izolatelor se face pe baza caracterelor morfotinctoriale (fig.59), de cultură și biochimice.

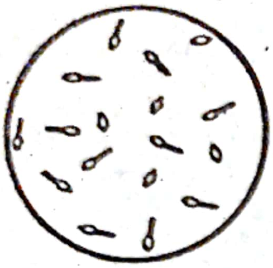


Fig.59 Cl.perfringens
Frotiu din cultură

La tulpinile izolate din toxiinfecții alimentare se poate stabili serotipul printr-o reacție de aglutinare.

d. Sensibilitatea la antibiotice. Cl.perfringens este sensibil la numeroase antibiotice: penicilină G, cloramfenicol, tetracicline, clindamicină, eritromicină, precum și la metronidazol, dar în terapie, alături de serul antitoxic, se utilizează în mod curent penicilina G.

De reținut că în G.G. tratamentul se instituie de urgență pe baza examenului clinic, fără a aștepta rezultatul examenului de laborator care confirmă numai diagnosticul clinic.

C. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TETANOSULUI

Tetanosul este o toxiinfecție cauzată de exotoxina Cl.tetani.

Poarta de intrare a microbilor în organism este reprezentată de variate soluții de continuitate ale învelișurilor (plagă traumatică, ombilicală, uterină, arsuri etc.) în care a pătruns pămînt sau unele materiale contaminate cu spori de Cl.tetani (ex. catgut, pansamente, instrumentar). Scăderea locală a potențialului de oxidoreducere, prin existența unor zone de ischemie, țesuturi necrozate, precum și a unei flore aerobe piogene, favorizează germinarea sporilor. Multiplicarea formelor vegetative se însoțește de elaborarea toxinei care difuzează în organism pe calea nervilor motori și pe cale sangvină pînă la sistemul nervos central unde abolește inhibiția sinaptică. Consecutiv, rezultă crize de contractură spastică a musculaturii striate care încep cu contractura mușchilor maseteri, trismusul fiind un simptom cu care bolnavul se poate prezenta la medicul stomatolog.

Diagnosticul tetanosului este eminamente clinic pe baza

Scanned with OKEN Scanner

simptomelor foarte caracteristice. Diagnosticul de laborator, şi anume cel bacteriologic, este utilizat numai pentru confirmarea post-mortem a unor cazuri de tetanos bănuit iatrogen (chirurgical, puerperal, neonatorum). Bacilii şi sporii tetanici vor fi căutaţi în produse din plagă (serozitate, ţesut excizat) sau în materiale presupuse contaminate (catgut, pansamente, talc, instrumente).

Diagnostic bacteriologic

a. Examenul microscopic direct nu permite de obicei evidenţierea Cl.tetani.

b. Izolarea se realizează prin însămînţarea probelor în bulion anaerob (ex. bulion VF cu acid thioglicolic) iar după cîteva zile de incubare la 37°C din bulionul în prealabil încălzit 30 minute la 80°C, pentru distrugerea formelor vegetative ale bacililor tetanici şi ale florei de asociaţie, se fac treceri pe plăci cu agar-sînge cu concentraţie crescută de agar(30-35g‰)pentru a obţine colonii izolate. Incubare anaerobă.

c. Identificarea izolatelor se bazează pe următoarele caractere:

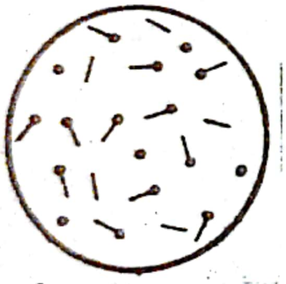


Fig.60 Cl.tetani
Frotiu din cultură

- morfotinctoriale: frotiul efectuat din cultură colorat Gram evidenţiază bacili lungi şi subţiri (în medie 4-5 µm 1/0,5 µm Ø), cu spor sferic, terminal, care le conferă aspectul de „ac cu gămălie" sau „beţişor de tobă"; sînt gram-pozitivi în culturi tinere (fig.60);

- de cultură. In bulion, bacilii cresc tulburîndu-l uniform; cultura degajă un miros caracteristic de corn ars.

Pe agar-sînge, coloniile sînt mari (4-6 mm Ø), translucide, cenuşii, înconjurate de o zonă îngustă de beta-hemoliză;

- de patogenitate. Pentru evidenţierea toxinogenităţii tulpinii izolate, care reprezintă metoda cea mai fidelă de diagnostic, se va practica testul de seroneutralizare pe şoarece: cîte 1 ml cultură în bulion va fi inoculat intramuscular la unul din membrele posterioare la şoareci neimunizaţi şi la şoareci protejaţi cu ser antitetanic. Animalele neimunizate prezintă contracturi care încep la membrul inoculat (acesta este fixat în extensie forţată) şi apoi se generali-

Scanned with OKEN Scanner

zează antrenînd moartea animalelor în 4 zile, în timp ce martorii imunizați supraviețuiesc.

d. Sensibilitatea la antibiotice. Cl.tetani are un spectru de sensibilitate la antibiotice similar cu cel prezentat de Cl.perfringens. In tratamentul tetanosului, alături de serul antitoxic, se folosește ca antibiotic de elecție penicilina G.

D. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL BOTULISMULUI

Botulismul (denumire de la lat.botulus = cîrnat) este o neurointoxicație severă cauzată de exotoxina Cl.botulinum. Există 7 tipuri antigenice de Cl.botulinum, notate de la A la G, diferențiate pe baza specificității serologice a toxinei elaborate.

Boala la om este cauzată de tipurile A, B, E și F, exotoxina A fiind cea mai puternică toxină cunoscută. La noi în țară s-a pus în evidență pînă în prezent, cu o singură excepție, numai tipul B.

Se cunosc 3 forme clinice de botulism. Cea mai frecventă este intoxicația alimentară, care survine în urma consumării alimentelor în care toxina botulinică este preformată (este vorba în special de alimente conservate în casă prin afumare, saramurare sau condimentare și păstrate o perioadă de timp după care sînt consumate fără prelucrare termică corespunzătoare, ex.cîrnat, șuncă, jambon, pește sărat, conserve de fructe și legume cu pH alcalin: mazăre, spanac, măsline). Mai rar a fost semnalat botulismul plăgilor, consecutiv colonizării plăgilor cu Cl.botulinum, și botulismul infantil care apare la sugari sub 6 luni prin elaborarea de toxină în intestin după germinarea sporilor introduși odată cu alimentele contaminate (ex. mierea de albine).

Boala se traduce prin simptome nervoase datorită paraliziei nervilor cranieni: diplopie, strabism, disfagie, disartrie, și digestive: grețuri, vărsături, constipație; moartea poate surveni prin paralizia mușchilor respiratori sau stop cardiac.

Diagnosticul de laborator confirmă diagnosticul clinic și precizează tipul de toxină care a cauzat îmbolnăvirea în vederea terapiei specifice cu ser antitoxic.

Produsele investigate sînt serul sangvin, lichidul de spălătură gastrică sau vărsătura, conținutul intestinal (la sugar), precum și lichidul din conserva alimentară incriminată. Toate pre-

dusele (cu excepţia serului), dacă nu sînt limpezi, se filtrează prin hîrtie de filtru.

Metoda curentă de diagnostic este evidenţierea şi identificarea toxinei, toxinotipia, prin testul de seroneutralizare pe şoarece. Produsul ca atare se inoculează în cantitate de 0,5 ml pe cale intraperitoneală la 4 şoareci; aceştia vor muri datorită intoxicaţiei, în interval de 96 ore cu paralizie flască a trenului posterior. In paralel cu acest lot martor, se vor inocula încă 2 loturi de şoareci cu produs în amestec cu 0,1 ml ser antibotulinic A şi respectiv ser antibotulinic B, amestecurile fiind în prealabil menţinute 30 minute la 37°C. Toate animalele vor muri cu excepţia lotului inoculat cu amestecul toxină-antitoxină omologă. Deci serul imun care a conferit protecţie, prin neutralizarea toxinei, indică tipul de toxină implicat în îmbolnăvire la om.

XVI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR CU BACTERII ANAEROBE NESPORULATE

Bacteriile anaerobe nesporulate, cunoscute sub numele de flora Veillon, includ coci și bacili gram-pozitivi, coci și bacili gram-negativi, actinomicete și spirochete (tabelul XVII).

Tabelul XVII. Bacterii anaerobe nesporulate

Caractere morfo-tinctoriale	Genul	Specia
•Coci gram-pozitivi		
- așezați în grămezi	Peptococcus	P.magnus ș.a.
- așezați în lanțuri	Peptostreptococcus	P.anaerobius ș.a.
•Coci gram-negativi		
- așezați în perechi	Veillonella	V.parvula ș.a.
•Bacili gram-pozitivi		
- ramificați x)	Actinomyces	A.israelii ș.a.
	Arachnia	Ar.propionica
- neramificați	Propionibacterium	P.acnes ș.a.
	Eubacterium	E.lentum ș.a.
•Bacili gram-negativi polimorfi	Bacteroides	B.fragilis B.melaninogenicus ș.a.
	Fusobacterium	F.necrophorum F.nucleatum ș.a.
	Leptotrichia	L.buccalis
•Spirochete	Treponema	T.vincentii ș.a.

x) Cuprind specii preferențial anaerobe, dar unele sînt facultativ anaerobe

Bacteriile anaerobe nesporulate sînt prezente pe tegument şi pe mucoasele tractusului respirator superior, bucală, vaginală, şi în intestin (în special în colon) făcînd parte din microbiota indigenă a acestor regiuni (în asociaţie cu specii aerobe sau facultativ anaerobe, pe care în mod obişnuit le depăşesc numeric x)) de unde şi numele de „floră endogenă". Datorită acestui habitat, în anumite condiţii de alterare a capacităţii antiinfecţioase a gazdei, locale (plăgi, traumatisme, perforaţii intestinale, carii dentare profunde etc.) sau generale (infecţii virale, carenţe nutritive, tumori maligne etc.), unele specii pot cauza infecţii, de obicei mixte (în asociaţie cu bacterii aerobe,facultativ anaerobe sau cu alţi anaerobi) cu localizări foarte variate.

Infecţiile de la nivelul plăgilor şi mucoaselor lezate (în special genitală şi intestinală) pot evolua cu stare bacteriemică sau septicemică şi localizări secundare metastatice. Cele mai frecvente specii întîlnite în septicemii aparţin genurilor Bacteroides (B.fragilis situîndu-se pe primul loc) şi Fusobacterium (F.necrophorum şi F.nucleatum). Propionibacterium acnes şi Peptostreptococcus anaerobius, specii bacteriemice, pot cauza, în anumite condiţii favorizante (intervenţii chirurgicale în sfera buco-maxilo-facială sau ginecologică), la persoane cu valvulopatii cardiace, endocardite subacute.

La nivelul cavităţii bucale, flora anaerobă nesporulată poate produce, în diferite asociaţii, pulpite şi gangrene pulpare, abcese dentare, osteite, sinuzite maxilare etc. Uneori mucoasa gingivală lezată poate fi invadată de asociaţia: L.buccalis - T.vincentii, agentul cauzal al gingivitei ulcerative necrotice acute caracterizată prin necroza şi ulceraţia papilelor interdentare.

B.melaninogenicus, specie comensală în special în orofaringe, este izolat cu mare frecvenţă din pungile parodontale în parodontita marginală cronică a adultului, fiind unul din microbii implicaţi în patogenia acestei boli. B.melaninogenicus mai poate fi asociat în pneumonii prin aspiraţia conţinutului bucal.

Actinomicoza cervico-facială este o entitate clinică cauza-

---

x) De ex. raportul florei anaerobe faţă de flora aerobă sau facultativ anaerobă este apreciat a fi de 10:1 la nivelul mucoasei bucale şi de 1000:1 la nivelul colonului

tă cel mai frecvent de A.israelii (vezi cap.XIV).

Diagnosticul de laborator al infecţiilor cauzate de bacterii anaerobe nesporulate este bacteriologic. In laboratorul clinic se cercetează prezenţa acestor bacterii în produsele patologice prin examen microscopic şi eventual cultură, stabilindu-se încadrarea lor într-un grup morfotinctorial sau cel mult într-un anumit gen. Identificarea de specie necesită adesea efectuarea unor teste biochimice care se pot realiza numai în laboratoarele de referinţă.

Diagnostic bacteriologic

a. Recoltarea şi transportul produselor patologice. Produsele patologice (puroi, spută, secreţie gingivală etc.) recoltate din infecţii mixte cu bacterii anaerobe au adesea un aspect caracteristic: culoare gris murdar, uneori şocolatie, cu miros fetid sau putrid. După prelevare, produsele trebuie transportate la laborator într-un interval de timp cît mai scurt pentru a nu altera viabilitatea speciilor oxigen-sensibile. Unele bacterii anaerobe sînt omorîte în cîteva secunde în contact cu oxigenul atmosferic iar altele ca: Bacteroides, Peptostreptococcus pot supravieţui 30-90 minute în prezenţa unei concentraţii de 2-8% oxigen. De aceea produsele destinate izolării bacteriilor anaerobe vor fi introduse în momentul recoltării în containere anaerobe pentru a fi transportate la laborator. In cazul puroiului se poate folosi procedeul „seringă anaerobă" (vezi cap.III) care asigură supravieţuirea bacteriilor cel puţin 30 minute.

In gingivita ulcerativă necrotică acută şi în alte infecţii fuso-spirochetice (angine ulceronecrotice, ulcere genitale etc.) în care diagnosticul se poate stabili numai prin examen microscopic direct, secreţia gingivală sau din alte ulceraţii se poate recolta cu tamponul de vată steril.

b. Examenul microscopic direct. Aspectul microscopic mai particular al unor anaerobi nesporulaţi în frotiurile colorate Gram (coci de dimensiuni mici, 0,3-0,5 µm, bacili gram-negativi foarte polimorfi, bacili gram-pozitivi ramificaţi etc.) orientează diagnosticul către o anumită categorie morfotinctorială.

B.fragilis: bacil scurt, gram-negativ, adesea colorat bipolar, capsulat, poate fi identificat rapid în produsul patologic prin imunofluorescenţă, metoda indirectă, dacă laboratorul dispune

de un ser anti-polizaharid capsular.

In gingivita ulcerativă necrotică acută, examenul microscopic al frotiului colorat Gram din secreţia gingivală evidenţiază leptotrichiile: bacili drepţi sau uşor încurbaţi, cu aspect de fus (centrul mai umflat şi capetele ascuţite), de 5-15 µm 1/0,8-1,5 µm Ø, dispuşi izolat sau în perechi, gram-negativi, şi spirochetele; microorganisme filamentoase, palid colorate în roşu, cu spirele largi, neregulate (fig.61). Implicarea etiologică a acestei asociaţii se face în contextul simptomatologiei clinice.

Fig.61 Asociaţia fuso-spirochetică
Frotiu din secreţie gingivală

In cazul anginei ulceronecrotice, examenul microscopic direct permite, prin decelarea asociaţiei fuso-spirochetice, diferenţierea de angina cu altă etiologie (de ex. difterică).

c. Izolarea se face în condiţii strict anaerobe.

In septicemii, bacteriemii, se practică hemoculturi repetate în bulion VF cu acid thioglicolic.

Produsele contaminate vor fi însămînţate prin metoda dispersiei semicantitative pe agar-sînge. După 24-72 ore de incubare anaerobă (vezi cap.IV) la 37°C se pot observa colonii mici, de tip S, translucide sau opace, înconjurate uneori de o zonă de hemoliză.

B.fragilis cultivă bine pe agar-sînge-glucozat cu 20% bilă formînd colonii înconjurate de un precipitat maroniu. B.melaninogenicus nu cultivă în prezenţa bilei dar necesită adăugarea la mediu, agar-glucozat cu sînge lacat de oaie, a unor factori de creştere: hemina şi menadiona. Coloniile se dezvoltă lent, în 1-2 săptămîni, producînd un pigment negru caracteristic.

d. Identificarea speciilor se face pe baza caracterelor morfotinctoriale, de cultură, biochimice (de ex. speciile din genul Fusobacterium se diferenţiază de cele din genul Bacteroides prin fermentarea treoninei) şi uneori de patogenitate (de ex.F.necrophorum este patogen pentru animale de laborator: cultura inoculată intravenos la şoarece determină leziuni necrotice ale labelor).

e. Sensibilitatea la antibiotice. Bacteriile anaerobe nesporulate sînt în general sensibile la beta-lactamine, cloramfenicol,

clindamicină, tetracicline, eritromicine şi metronidazol [x] şi natural rezistente la oligozaharide. Sensibilitatea la antibiotice a florei Veillon poate varia însă de la o tulpină la alta chiar în cadrul aceleiaşi specii (mai ales în grupul bacililor gram-negativi), de aceea antibiograma este necesară în toate cazurile clinice severe.

Pentru testarea sensibilităţii la antibiotice, metoda difuzimetrică nu este indicată din cauza dificultăţilor de standardizare şi precizare a zonelor de inhibiţie critică pentru fiecare antibiotic.

In laboratorul clinic, antibiograma pentru flora Veillon se poate efectua printr-o metodă simplă, metoda lui Wilkins şi Thiel. Ca mediu se foloseşte bulionul thioglicolat repartizat în volum fix într-o serie de eprubete (în raport cu numărul de antibiotice care se testează) în care se introduc discuri din hîrtie de filtru impregnate cu anumite concentraţii de antibiotice (ex. 10 U penicilină, 30 μg cloramfenicol, 2 μg clindamicină etc.). Inoculum este reprezentat de o picătură din cultura de 20 ore a microbului testat în mediu lichid. Incubare aerobă la 37°C, 24-48 ore. Sensibilitatea sau rezistenţa microbului însămînţat sînt interpretate în raport cu lipsa creşterii sau dezvoltarea acestuia în prezenţa antibioticului.

Există şi tehnici mai complicate care folosesc mai multe concentraţii pentru fiecare antibiotic, permiţînd astfel o mai exactă apreciere a sensibilităţii microbului. Ele sînt practicate prin metoda diluţiilor în mediu lichid sau în agar (procedeu de referinţă) şi utilizează un inoculum standardizat.

---

[x] Fac excepţie tulpinile de B.fragilis cu rezistenţă naturală la beta-lactamine şi cele de Actinomyces şi Propionibacterium cu rezistenţă naturală la metronidazol

XVII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE BACILI ACIDO-ALCOOLO-REZISTENTI

Bacilii acido-alcoolo-rezistenţi (a.a.r.) sînt denumiţi astfel datorită proprietăţii particulare de a rezista la decolorare prelungită cu acizi minerali şi alcool după colorare prealabilă la cald cu soluţie de fucsină concentrată (coloraţia Ziehl-Neelsen). Această comportare deosebită faţă de toate celelalte bacterii se datoreşte conţinutului foarte bogat în lipide a peretelui celular.

Bacilii a.a.r. sînt încadraţi în genul Mycobacterium cu numeroase specii, din care reţinem:

i. specii patogene

- agenţii etiologici ai tuberculozei:
  - M.tuberculosis (bacilul Koch)
  - M.bovis
  - M.africanum x)
- agentul etiologic al leprei:
  - M.leprae

ii. specii condiţionat sau accidental patogene (numite generic mycobacterii atipice), agenţii cauzali ai unor infecţii asemănătoare tuberculozei (cunoscute sub numele de micobacterioze) care survin la persoane cu deficienţe ale apărării antiinfecţioase locale sau generale:

- M.kansasii
- M.scrofulaceum
- M.avium
- M.intracellulare (bacilul Battey)
- M.marinum
- M.ulcerans
- M.fortuitum ş.a.

x) Cauzează tuberculoza umană în Africa tropicală

iii. speciі nepatogene, saprofite ale mediului extern sau comensale pe mucoasa genito-urinară sau în cavitatea gastrică, care pot contamina ocazional unele produse patologice (ex. probe de urină, spălătură gastrică) în care cercetăm prezența bacililor tuberculozei:

- M.smegmatis
- M.gastri
- M.terrae ş.a.

A.DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI PULMONARE

Tuberculoza pulmonară este cea mai freeventă formă clinică de tuberculoză, cauzată de M.tuberculosis. In cazuri rare, poate fi implicat şi M.bovis.

Suspectat clinic şi radiologic, diagnosticul de tuberculoză pulmonară este stabilit cu certitudine prin examen bacteriologic.

1. Diagnostic bacteriologic

Produsul cel mai reprezentativ este sputa, prelevată în condiţiile menţionate la cap.III. Se recoltează cîte o probă de spută matinală, 3 zile consecutiv. Dacă probele recoltate nu pot fi imediat examinate vor fi păstrate la frigider la 4°C.

La pacienţii care nu expectorează se va examina spălătura gastrică x), tamponul laringian sau spălătura bronşică.

La persoanele cu tuse slab productivă se poate încerca stimularea secreţiilor bronşice prin aerosoli calzi cu soluţie 15% de clorură de sodiu.

a. Examenul microscopic direct. Din porţiunile muco-purulente ale sputei sau din sedimentul de centrifugare al probei (vezi mai jos) se efectuează 2 frotiuri care se colorează Ziehl-Neelsen. La examenul microscopic se evidenţiază bacili subţiri, de lungime variabilă (1-5 μm/0,2-0,4 μm), cu extremităţi rotunjite şi cu aspect uneori granular (granulaţiile lui Much); se dispun izolat sau în grupuri de 2-3 elemente formînd litere unghiulare (V, X, Y) (fig. 62). Fiind acido- şi alcoolo-rezistenţi, bacilii tuberculozei sînt uşor reperaţi prin culoarea roşie strălucitoare care contrastează

---

x) Probele de spălătură gastrică vor fi imediat neutralizate cu soluţie 10% de carbonat de sodiu în prezenţa unui indicator de pH

cu fondul albastru al preparatului.

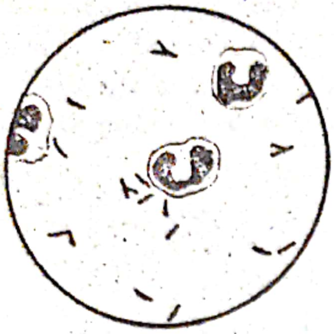


Fig.62 M.tuberculosis
Frotiu din spută

Prezența bacililor a.a.r. în frotiul din spută are valoare diagnostică dar bacilоscopia nu permite stabilirea speciei.

Pentru a considera un examen microscopic negativ este necesar să se examineze cel puțin 100 de cîmpuri microscopice, dar chiar și în acest caz un rezultat negativ nu poate exclude diagnosticul de tuberculoză deoarece sub o anumită concentrație a bacililor în spută (40.000 bacili a.a.r./ml) șansa evidențierii lor la microscop este nulă.

Dacă sînt decelați numai 1-3 bacili a.a.r. pe tot preparatul, confirmarea rezultatului se va face după examinarea celui de-al doilea frotiu sau recurgînd la o nouă probă de spută.

Mai sensibilă și mai rapidă este examinarea în lumină ultravioletă a frotiurilor colorate fluorescent cu auramină-rodamină.

b. Izolarea pe medii de cultură este obligatorie în cazul produselor cu examen microscopic negativ; de asemeni această etapă permite identificarea speciei bacililor a.a.r. izolați și efectuarea antibiogramei.

Insămînțarea sputei se va face după îndepărtarea florei de asociație - decontaminare și după fluidificarea produsului - omogenizare care facilitează eliberarea unor mycobacterii înglobate în diferite materiale organice. Aceste 2 operații se realizează simultan prin tratarea sputei cu un volum egal sau dublu de hidroxid de sodiu 4% (în funcție de vîscozitatea probei). Amestecul se agită energic în eprubetă 2-3 minute și apoi se menține la 37°C timp de 30 minute; după scoaterea de la termostat se neutralizează cu o sol.15% de fosfat monopotasic în prezența albastrului de bromthimol ca indicator.

Produsul astfel tratat poate fi centrifugat (pentru concentrarea bacililor) 30 minute la 3000 r.p.m. iar sedimentul însămînțat pe cîte 3-4 eprubete cu mediu Löwenstein-Jensen x) în cantitate

x) Mediu complex pe bază de ou, glicerină, asparagină, feculă de cartof și săruri minerale; ca substanță bacteriostatică conține verde malachit. Mediul este solidificat în pantă prin coagulare la baia de nisip 45 minute la 85°C

de 1 ml/tub. Culturile se incubează aerob, la 37°C şi se urmăresc săptămînal, timp de 2 luni.

c. Identificarea ca specie a mycobacteriei izolate se face pe baza mai multor criterii:

- caractere de cultură. M.tuberculosis cultivă lent, în 2-4 săptămîni, formînd colonii R, conopidiforme, alb-gălbui, uşor detaşabile de pe suprafaţa mediului; creşterea pe mediul Löwenstein-Jensen este denumită „eugonică". M.bovis cultivă mai lent, în 4-8 săptămîni; creşterea este săracă, „disgonică", sub formă de colonii mici, de tip S, nepigmentate, aderente de suprafaţa mediului. Cultura este stimulată în dezvoltare dacă glicerolul din mediu este înlocuit cu piruvat de sodiu. M.africanum cultivă de asemeni disgonic dar sub formă de colonii R.

Mycobacteriile atipice, în funcţie de specie, cultivă în intervale variabile de timp (de la cîteva zile la 2-3 săptămîni), sub formă de colonii S sau R, nepigmentate sau pigmentate la întuneric (scotocromogene, ex. M.scrofulaceum) sau numai după expunere la lumină (fotocromogene, ex. M.kansasii);

- caractere morfotinctoriale. Frotiul din cultură examinat la microscop evidenţiază bacili a.a.r. aranjaţi paralel unii faţă de alţii în sens longitudinal formînd corzi (serpentine) pentru M.tuberculosis şi M.bovis şi dispuşi izolat sau în mici grămezi pentru celelalte mycobacterii;

- caractere biochimice. Producerea de acid nicotinic, evidenţiată prin testul Konno (sau testul niacinei) este principalul caracter biochimic care permite diferenţierea între M.tuberculosis care dă testul pozitiv şi M.bovis şi mycobacteriile atipice care sînt Konno-negative. Sensibilitatea la hidrazida acidului tiofen carboxilic (TCH), ca şi reducerea nitratului permit de asemeni diferenţierea între M.tuberculosis şi M.bovis.

Un alt criteriu de diferenţiere între mycobacterii îl constituie producerea de catalază termorezistentă: spre deosebire de M.tuberculosis şi M.bovis care pierd catalaza prin încălzire 15 minute la 68°C, mycobacteriile atipice îşi păstrează activitatea catalazică; de reţinut că tulpinile de M.tuberculosis şi M.bovis care au dobîndit rezistenţă înaltă la hidrazidă ($>10\ \mu g/ml$) sînt

catalazo-negative (tabelul XVIII).

Tabelul XVIII. Caractere biochimice de diferenţiere între mycobacteriile tuberculozei şi mycobacteriile atipice

Specia	Producerea de catalază termorezistentă	Reducerea nitratului	Sensibilitatea la TCH 10 ug/ml	Producerea de acid nicotinic
M.tuberculosis	-	+	R	+
M.bovis	-	-	S	-
M.atipice	+	V	R	-

V = comportare variabilă

d. Implicarea etiologică a mycobacteriei izolată. Spre deosebire de M.tuberculosis şi M.bovis, care sînt recunoscute ca agenţi etiologici ai infecţiei ori de cîte ori sînt decelate în spută, pentru mycobacteriile atipice, implicarea ca infectanţi necesită izolarea lor repetată (de cel puţin 4 ori), în cantitate mare (> 100 colonii/tub) şi în absenţa bacililor tuberculozei.

e. Sensibilitatea la medicamente antituberculoase. Bacilii tuberculozei sînt natural sensibili la o serie de antibiotice şi chimioterapice: streptomicină, rifampicină, kanamicină, cicloserină, hidrazidă, etionamidă, pirazinamidă, etambutol,dar pot dobîndi rezistenţă în condiţiile unui tratament nejudicios. In consecinţă,tratamentul se va face pe bază de antibiogramă cu asociaţii de tuberculostatice. Antibiograma se poate efectua direct din produsul patologic (ACP),dacă acesta conţine un număr suficient de bacili la examenul microscopic (cel puţin 1 bacil/cîmp),sau după izolarea mycobacteriilor în cultură (ACS). Ea se practică curent prin metoda concentraţiilor absolute care constă în însămînţarea tulpinii de testat pe mediul Löwenstein-Jensen ce conţine anumite concentraţii de tuberculostatice, denumite „concentraţii critice" (ex. HIN 0,2 şi 1 γ/ml mediu, SM 2 şi 10 γ/ml mediu, RMP 20 şi 40 γ/ml mediu, ETB 2 şi 5 γ/ml mediu etc.) recomandate în raport cu concentraţiile medii realizate în mod obişnuit în umorile organismului după terapia specifică.

Pentru ACS, din tulpina de testat se prepară un inoculum standardizat (suspensie microbiană care conţine 1 mg bacili/ml apă

distilată) şi se însămînţează cîte 0,2 ml în fiecare tub cu tuberculostatice şi în 2 tuburi martor (fără adaos de tuberculostatice).

Interpretarea rezultatelor se face după 21 zile de incubare la termostat. Metoda concentraţiilor absolute permite o apreciere semicantitativă prin compararea dezvoltării culturii pe tuburile martor (unităţi viabile) şi pe tuburile cu tuberculostatice (mutanţi rezistenţi). Vor fi considerate rezistente, tulpinile care prezintă o dezvoltare identică pe mediile de cultură cu tuberculostatice şi pe tuburile martor; moderat rezistente, tulpinile la care se constată un număr mai redus de colonii pe mediile cu tuberculostatice comparativ cu tuburile martor; şi sensibile, tulpinile care nu cresc pe mediile cu tuberculostatice sau dezvoltă un număr redus de colonii, reprezentînd mai puţin de 1% din numărul coloniilor de pe tuburile martor.

Intensitatea creşterii culturii se notează cu plusuri (+, ++, +++), iar sub 20 colonii se indică numărul acestora.

Mycobacteriile atipice prezintă o polichimiorezistenţă naturală la hidrazidă, streptomicină şi PAS încît practicarea antibiogramei este utilă nu numai pentru terapie ci constituie şi un criteriu orientativ pentru identificarea acestui grup de mycobacterii.

2. Intradermoreacţia la tuberculină

Intradermoreacţia la tuberculină evidenţiază starea de sensibilizare de tip întîrziat care se instalează la orice persoană consecutiv primoinfecţiei tuberculoase sau după vaccinarea BCG.

In R.S.R. se folosesc preparate purificate de tuberculină numite PPD (Purified Protein Derivative) care sînt livrate de Institutul Cantacuzino Bucureşti în 2 doze: doza I, cu 2 unităţi tuberculină (UT)/0,1 ml şi doza II, cu 10 UT/0,1 ml.

Se injectează intradermic, pe faţa anterioară a antebraţului, 0,1 ml PPD IC 65 care conţine 2 UT. Reacţia se citeşte la 72 ore luîndu-se în consideraţie numai zona de induraţie de la locul inoculării. De la 10 mm Ø, reacţia este considerată pozitivă. Persoanele cu reacţie negativă la 2 UT vor fi retestate cu 10 UT, într-un interval de timp care nu trebuie să depăşească 15 zile.

Interpretarea rezultatelor:

- reacţie negativă: infecţia tuberculoasă este exclusă cu condiţia ca pacientul să nu fie supus terapiei imunodepresive sau să se găsească într-o stare de anergie fiziologică (sarcină) sau patologică (convalescenţă după infecţii virale: gripă, rujeolă);

- <u>reacţie pozitivă</u>: pacientul a făcut primoinfecţia tuberculoasă. Tuberculoza (boală) este însă probabilă numai în următoarele circumstanţe:

• reacţie pozitivă foarte intensă la doza I (flictenă, ulceraţie, necroză);

• surprinderea virajului reacţiei de la negativ la pozitiv la copiii nevaccinaţi BCG;

• „saltul tuberculinic" (mărirea diametrului reacţiei cu mai mult de 8 mm între două testări).

B. <u>DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TUBERCULOZEI EXTRAPULMONARE</u>

Leziunile tuberculoase pot evolua practic la nivelul oricărui ţesut sau organ. Astfel sînt descrise: tuberculoza ganglionară, osteo-articulară, tuberculoza seroaselor (meningită cu lichid clar, pleurezii, peritonite), tuberculoza renală, genitală, cutanată, intestinală, laringiană, oculară etc.

In teritoriul buco-maxilo-facial, leziunile tuberculoase se localizează mai frecvent la nivelul părţilor moi şi la ganglionii submandibulari şi cervicali; mai rar sînt interesate maxilarele şi excepţional glandele salivare.

In majoritatea cazurilor, tuberculoza bucală este manifestarea secundară a unui proces tuberculos, cel mai adesea pulmonar, contaminarea realizîndu-se prin intermediul sputei bacilifere; apariţia bolii este favorizată de unele cauze locale: traumatisme protetice şi masticatorii, iritaţii prin rădăcini dentare ş.a. Clinic se traduce prin <u>ulceraţii</u> care apar în special pe limbă şi pe mucoasa jugală.

Mai rar, tuberculoza orală este o manifestare de primoinfecţie, frecvent cu bacili bovini, prin consum de lapte insuficient prelucrat termic provenit de la animale cu mastită tuberculoasă. Clinic se prezintă sub formă de <u>adenite cervicale sau submandibulare</u> cu tendinţă la ramolire şi fistulizare.

<u>Diagnosticul de laborator</u> se efectuează parcurgînd aceleaşi etape ca şi pentru tuberculoza pulmonară, cu unele precizări.

In general examenul microscopic practicat din produsele patologice recoltate de la bolnavi cu tuberculoză extrapulmonară (ex. l.c.r., urină, exsudat pleural, articular, sînge menstrual, produs de puncţie ganglionară, biopsii de la nivelul pielii) este

negativ într-un procent mult mai mare de cazuri decît în tuberculoza pulmonară x). Pentru unele produse (ex. l.c.r., urină), şansele de evidenţiere a bacililor a.a.r. pot fi mărite prin concentrarea prealabilă a acestora prin centrifugare (30 minute la 3000 r.p.m.), frotiurile, ca şi însămînţările fiind practicate din sediment.

In cazul suspiciunii de tuberculoză renală se vor examina 3 probe de urină, recoltate la 1-2 zile interval. Prezenţa bacililor a.a.r. pe frotiul colorat Ziehl-Neelsen nu are valoare diagnostică din cauza posibilităţii de contaminare a urinii cu mycobacterii nepatogene (ex. <u>M.smegmatis</u>).

Implicarea ca infectant a unei mycobacterii atipice izolată dintr-un produs contaminat (ex. puroi din abcese sau adenite fistulizate, serozitate din ulceraţii, urină) se bazează pe respectarea aceloraşi principii ca şi în cazul sputei.

In tuberculoza extrapulmonară, avînd în vedere sărăcia în bacili a produselor, se mai poate utiliza pentru izolarea mycobacteriilor, alături de însămînţarea pe medii de cultură, <u>inocularea la cobai</u>, animal foarte sensibil la bacilii tuberculozei xx). Probele necontaminate se inoculează ca atare iar cele contaminate după decontaminare. Inocularea se face subcutanat la 2 cobai, pe faţa internă a coapsei, în volum de maximum 1 ml. Animalele sînt urmărite pînă la 90 zile.

In cazul unui produs bacilifer, după 2-3 săptămîni apare, la locul de inoculare, un nodul care se ramoleşte, fistulizează, formînd o ulceraţie „şancru de inoculare" care persistă pînă la moartea animalului. Reacţia locală se însoţeşte de adenopatie inghinală satelită. Animalul moare de obicei în 6-8 săptămîni, prezentînd la necropsie leziuni ganglionare (ganglionii sînt hipertrofiaţi şi cazeificaţi) şi viscerale (splina şi ficatul sînt mărite de volum, cu granulaţii sau plaje cazeoase pe suprafaţă; rar se observă noduli în pulmon). Evidenţierea bacililor a.a.r. pe frotiurile efectuate din organe şi izolarea acestora în culturi confirmă diagnosticul de tuberculoză.

---

x) Fac excepţie produsele din ulceraţii bucale tuberculoase sau din leziuni primare care conţin adesea un număr mare de bacili a.a.r.

xx) Fac excepţie tulpinile hidrazido- şi rifampicinorezistente care sînt nepatogene sau au virulenţă redusă pentru cobai. Myeobacteriile atipice sînt de asemeni nepatogene pentru cobai

Practicarea intradermoreacţiei la tuberculină la cobai, după 5-6 săptămîni de la inoculare permite, în cazul unei reacţii pozitive (infiltraţie de minimum 5 mm Ø, eritem şi uneori necroză centrală), stabilirea mai precoce a diagnosticului.

C. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR IN LEPRA

Lepra este o boală cu incubaţie lungă (2-5 ani) şi evoluţie cronică, cauzată de M.leprae sau bacilul Hansen, bacterie necultivabilă.

Modul de contaminare în lepră nu este bine elucidat dar se consideră că transmiterea s-ar face pe cale aerogenă, prin intermediul secreţiilor nazale bacilifere ale bolnavilor cu rinită leproasă, precum şi prin contact direct prelungit cu leziunile cutanate (leproame) ulcerate.

Din punct de vedere clinic se disting 2 forme polare de lepră: tuberculoidă (nervoasă sau anestezică) şi lepromatoasă (nodulară).

Lepra tuberculoidă este o formă benignă de boală, care evoluează la persoane cu o bună reactivitate imunologică celulară a organismului; ea este puţin contagioasă datorită numărului redus de bacili din leziuni.

Lepra tuberculoidă debutează prin apariţia unor macule cutanate, cel mai adesea depigmentate şi hipoestezice. Definitorii pentru această formă de lepră sînt tulburările nervoase care apar consecutiv infiltraţiei nervilor periferici printr-un ţesut de granulaţie şi îngroşării acestora cu fenomene de compresiune: zone de anestezie distală cu topografie în „şosetă", parestezii, paralizii motorii etc. La tulburările nervoase se mai adaugă tulburări trofice (ulcere trenante ale extremităţilor, mîna de maimuţă, mal perforant plantar etc.) şi leziuni de osteoliză.

Datorită pierderii sensibilităţii termo-algezice, extremităţile pot fi uşor traumatizate producîndu-se mutilări.

Lepra lepromatoasă evoluează la persoane cu deficienţe ale imunităţii mediată de celule. Ea este o formă de boală malignă, progresivă şi foarte contagioasă datorită bogăţiei leziunilor în bacili.

Clinic se caracterizează prin apariţia unor noduli - leproame, interesînd în special faţa şi extremităţile. Infiltraţia nodulară a dermului feţei conferă bolnavului un aspect caracteristic „facies leonin". Interesarea mucoaselor este de asemenea precoce. Este de reţinut rinita leproasă, cu secreţie muco-purulentă intens bacilliferă, asociată uneori cu cheratită, iridociclită sau retinită care pot duce la orbire; leziunile se pot extinde la mucoasa bucală.

Ulceraţia nodulilor antrenează distrucţia degetelor, nasului, urechilor etc., ceea ce duce la desfigurări impresionante iar în cazul leziunilor bucale şi la tulburări în deglutiţie şi fonaţie.

Atingerile nervoase sînt mai discrete decît în lepra tuberculoidă.

Intr-un stadiu mai avansat al bolii apar poliadenopatii şi leziuni viscerale.

Diagnosticul de laborator în lepră este bacteriologic şi imunologic.

1. Diagnostic bacteriologic

Diagnosticul bacteriologic este util pentru confirmarea diagnosticului clinic în stadiul avansat al bolii dar indispensabil pentru stabilirea diagnosticului în faza sa precoce şi în cazurile de suspiciune a leprei la contacţi.

a. Examenul microscopic direct reprezintă singura metodă de diagnostic. M.leprae poate fi evidenţiat în frotiuri colorate Ziehl-Neelsen efectuate din diferite produse patologice, în special mucus nasal sau biopsie de mucoasă nasală în stadiul precoce al bolii sau la contacţi, şi produsul de scarificare sau biopsie a nodulilor după apariţia leziunilor cutanate x).

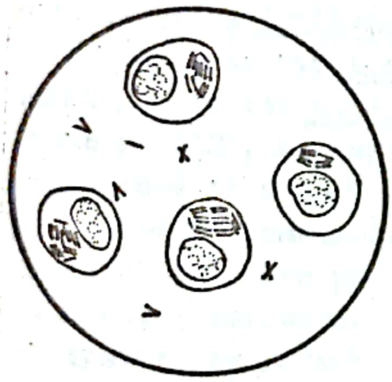


Fig.63 M.leprae
Preparat din leprom

Bacilii Hansen seamănă ca morfologie şi colorabilitate cu agenţii etiologici ai tuberculozei (bacili de 1-8 um l /0,3-0,5 um Ø, drepţi sau uşor încurbaţi, cu capete rotunjite, a.a.r.) dar au uneori o dispoziţie caracteristică care permite stabilirea diagnosticului de lepră: aranjare paralelă în grămezi (pachete) de formă rotunjită, numite „globi", situate cel mai frecvent intracelular, în citoplasma macrofagelor (fig.63).

Dacă dispoziţia bacililor nu este caracteristică, pretînd la confuzie cu bacilul Koch, însămînţarea pe mediul Löwenstein-Jensen şi inocularea la cobai pot tranşa diagnosticul (ambele probe sînt negative în lepră).

M.leprae n-a putut fi pînă în prezent cultivat dar s-a obţinut multiplicarea sa în planta de şoarece şi mai recent în organismul unui mamifer dungat din America de sud, tatu.

b. Sensibilitatea la medicamente antileproase. Bacilul Han-

---

x) Mai rar M.leprae este cercetat în fragmente de piele, biopsie de nervi, serozitatea obţinută prin puncţie ganglionară sau testiculară

sen este sensibil la sulfone (ex. Dapsona), rifampicină, clofazimină.

2. Diagnostic imunologic

Cercetarea stării de sensibilizare alergică prin intradermoreacția la lepromină [x)] permite stabilirea formei clinice de boală. Acest test este pozitiv în lepra tuberculoidă şi negativ în lepra lepromatoasă. Reacţia va fi urmărită atît precoce, citire la 48 ore (testul Fernandez, tradus prin apariţia unei papule eritematoase) cît şi tardiv, la 28 zile (testul Mitsuda, caracterizat prin apariţia unui nodul de dimensiuni variabile în funcţie de intensitatea reacţiei).

[x)] Suspensie de bacili omorîţi prin căldură, obţinută din leprom

XVIII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL UNOR INFECTII CAUZATE DE SPIROCHETE

Spirochetele sînt bacterii filamentoase, mobile (grație unor flageli periplasmici), spiralate și flexibile.

Spirochetele patogene pentru om sînt incluse în 2 familii: Spirochetaceae cu genurile Treponema și Borrelia [x] și Leptospiraceae cu genul Leptospira.

In genul Treponema se încadrează 2 specii patogene natural numai pentru om: T.pallidum (cu diferite subspecii) și T.carateum (tabelul XIX). Ele sînt necultivabile, au o morfologie asemănătoare și aceeași structură antigenică. Tot din genul Treponema mai fac parte specii comensale care habitează mucoasele genitală și bucală; unele din acestea pot cauza, în asociație cu alte bacterii prezente la nivelul mucoaselor, infecții supurative mixte, de ex. gingivita ulcerativă necrotică acută (vezi cap.XVI). Treponemele comensale sînt cultivabile pe medii artificiale complexe în condiții de anaerobioză.

Genul Treponema mai include o specie: T.paraluiscuniculi, patogenă natural numai pentru iepure, importantă de cunoscut deoarece T.pallidum este întreținută în laborator prin inoculare intratesticulară la iepure. Ea se aseamănă morfologic cu T.pallidum și este de asemeni necultivabilă; se diferențiază însă antigenic, ceea ce permite excluderea, pe baza examenului serologic, a animalelor infectate cu T.paraluiscuniculi.

A. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SIFILISULUI

Sifilisul este o boală caracteristică omului, foarte contagioasă, cauzată de T.pallidum, subspecia pallidum (vezi tabelul

---

[x] In genul Borrelia se încadrează agenții etiologici ai febrelor recurente, boli transmisibile omului prin păduche sau căpușă

XIX). Infecţia este dobîndită cel mai frecvent pe cale sexuală dar în aproximativ 10% din cazuri este posibilă şi contaminarea extragenitală, de ex. pe cale orală prin sărut sau diferite obiecte (ta-

Tabelul XIX. Genul Treponema

1. Treponeme patogene pentru om	a. T.pallidum	- subspecia pallidum, agentul etiologic al sifilisului veneric şi congenital;
		- subspecia endemicum x), agentul cauzal al sifilisului endemic, nevenerio;
		- subspecia pertenue, agentul cauzal al pianului
	b. T.carateum	- agentul etiologic al pintei
2. Treponeme comensale	a. Pe mucoasa bucală	- T.scoliodontum
		- T.vincentii
		- T.denticola etc.
	b. Pe mucoasa genitală	- T.refringens
		- T.phagedenis (tulpinile Reiter şi Kazan)
		- T.minutum etc.
3. Treponeme patogene pentru iepure		- T.paraluiscuniculi

x) Sifilisul endemic, pianul şi pinta sînt boli nevenerice, existente în stare endemică în unele ţări din Africa, Asia, America. Ele se manifestă prin leziuni cutanate, infecţia transmiţîndu-se, în condiţii de igienă precară, prin contact direct cu leziunile deschise ale bolnavilor.

cîmuri, pahare, instrumentar stomatologic) utilizate imediat după contaminare, în timpul autopsiilor sau examenelor ginecologice efectuate de medic fără mănuşi de protecţie, în cursul operaţiilor, a transfuziilor directe etc.

Diagnosticul de laborator variază în raport cu perioada de boală. Din acest punct de vedere se descriu 3 stadii evolutive, relativ bine definite.

Scanned with OKEN Scanner

Stadiul primar se caracterizează prin 2 simptome majore: „şancrul" sifilitic şi adenopatia satelită.

Sancrul apare la aproximativ 3 săptămîni de la contactul infectant; el se prezintă ca o ulceraţie superficială rotundă, bine circumscrisă, de 0,5-2 cm Ø, cu baza indurată, cartonată - şancru dur -, nedureroasă, care nu supurează. Leziunea, de obicei unică, se localizează pe mucoasa şi tegumentele genitale (ex. mucoasa glandului, şanţul balano-prepuţial şi scrot la bărbat, labre, col uterin şi vagin la femeie), mai rar extragenital în regiunea ano-rectală, la nivelul buzelor sau a cavităţii bucale (pe limbă, gingie sau amigdale şi foarte rar genian sau palatin); leziunea este foarte bogată în spirochete.

La o săptămînă de la instalarea şancrului apare adenopatia satelită, inghinală şi respectiv submandibulară: ganglionii sînt hipertrofiaţi, duri, mobili şi nedureroşi.

Chiar în absenţa tratamentului şancrul se vindecă în 5-7 săptămîni dar treponemele persistă în ganglionii limfatici de unde difuzează în ţesuturi şi umori, generînd apariţia stadiului secundar.

Stadiul secundar corespunde unei infecţii generalizate, cu caracter septicemic. Simptomele apar la aproximativ 45-50 zile de la instalarea şancrului şi se traduc prin febră, cefalee, artralgii, micropoliadenopatii, leziuni cutanate: rozeole (exantem maculo-papulos roşu), sifilide papuloase, şi mucoase: plăci mucoase. In unele cazuri, plăcile mucoase de la nivelul cavităţii bucale pot constitui unica manifestare a perioadei secundare; fiind foarte contagioase, ele trebuie cunoscute şi descoperite de medicul stomatolog. Se prezintă ca eroziuni superficiale ale mucoasei, de aproximativ 10 mm Ø, neindurate, indolore, de culoare roşie, cu suprafaţa lăcuită, localizate de predilecţie la nivelul limbii, buzelor, gingiei şi faringelui.

In stadiul secundar pot apare şi manifestări viscerale: meningite, corioretinite, nefrite, hepatite şi periostite sifilitice.

Sifilisul secundar, la fel de contagios ca şi cel primar, poate evolua timp de cîteva luni (mai rar 1-3 ani). Se admite că aproximativ 25% din bolnavi se vindecă chiar fără tratament iar la 25% infecţia evoluează latent pînă la sfîrşitul vieţii.

Stadiul terţiar apare numai la unii bolnavi, netrataţi sau insuficient trataţi, după o latenţă variabilă de la 3 la 20 ani.

Sifilisul terţiar se caracterizează prin apariţia unor leziuni granulomatoase: gome cutanate şi osoase, modificări degenerative ale sistemului nervos (paralizie generală progresivă, tabes) şi leziuni cardio-vasculare (anevrism aortic, insuficienţă aortică).

Gomele reprezintă manifestarea cea mai frecventă a sifilisului bucal. Ele se prezintă sub formă de ulceraţii profunde, localizate în special la nivelul bolţii palatine determinînd distrucţia acesteia şi uneori perforarea în cavitatea nazală. Interesarea concomitentă a palatului moale poate cauza tulburări în fonaţie, masticaţie şi respiraţie. Gomele conţin un număr redus de treponeme.

Sifilisul congenital. Ca urmare a faptului că treponemele pot traversa placenta, sifilisul congenital este întîlnit la copiii născuţi de o mamă infectată în timpul sarcinii; în acest caz şancrul lipseşte, copilul prezentînd la naştere simptome de sifilis

secundar sau terţiar.

Diagnosticul de laborator în sifilis se practică prin metode bacteriologice şi serologice.

1. Diagnostic bacteriologic

a. Examenul microscopic. Deoarece T.pallidum este necultivabilă, diagnosticul bacteriologic constă numai în examen microscopic pe fond negru x),efectuat din serozitatea obţinută prin comprimarea bazei şancrului.

Persoana care prelevă produsul va purta mănuşi chirurgicale din cauciuc. După îndepărtarea eventualelor cruste de pe suprafaţa şancrului (cu blîndeţe pentru ca leziunea să nu sîngereze), acesta se spală cu un tampon îmbibat în soluţie salină izotonă sterilă, după care se şterge cu o compresă din tifon sterilă. Apoi se comprimă baza leziunii între degete iar picătura de serozitate obţinută se prelevă prin atingere cu o lamelă; se montează preparatul între lamă şi lamelă şi se examinează la microscopul cu fond negru.

T.pallidum apare în cîmpul întunecat al microscopului ca un microorganism filamentos strălucitor, de 6-20 /um 1/0,10-0,18 /um Ø (în medie 10-13 /um 1/0,15 /um Ø), cu 4-14 spire regulate, strînse, adînci şi capete efilate (fig.64); este foarte mobilă prezentînd mişcări de rotaţie, translaţie şi flexie, mişcarea de flexie fiind caracteristică treponemelor patogene.

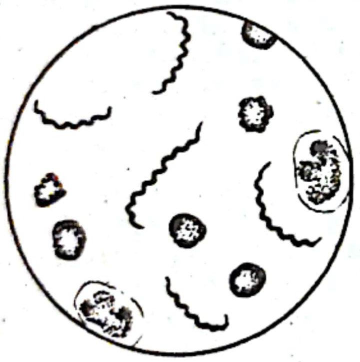


Fig.64 T.pallidum
Preparat din serozitatea din şancru

In cazul şancrelor genitale şi bucale, T.pallidum trebuie diferenţiată de spirochetele comensale localizate la acest nivel. Singura metodă certă de diferenţiere prin examen microscopic este colorația imunofluorescentă, tehnica directă.

Examenul bacterioscopic se practică numai în primele 2-3 săptămîni de evoluţie a şancrului, pînă la pozitivarea serologiei.

b. Sensibilitatea la antibiotice. T.pallidum este sensibilă la majoritatea antibioticelor xx), inclusiv la penicilină care constituie antibioticul de elecţie în tratamentul sifilisului; în caz de

---

x) T.pallidum se colorează „palid" chiar prin metode de supracolorare

xx) Cu excepţia oligozaharidelor

sensibilizare la penicilină, se va utiliza ca medicaţie alternativă tetraciclina iar la gravide eritromicina.

2. Diagnostic serologic

Cercetarea anticorpilor reprezintă metoda cea mai folosită de diagnostic. In acelaşi timp, practicarea reacţiilor serologice cantitativ (cu diluţii de ser) şi în dinamică (pe probe repetate de ser) permite verificarea eficienţei terapiei prin urmărirea evoluţiei curbei anticorpilor.

Practic, serodiagnosticul poate fi efectuat în toate cele 3 perioade ale infecţiei sifilitice, în serul bolnavului găsindu-se mai multe categorii de anticorpi corespunzători diferitelor antigene ale T.pallidum.

a. Structura antigenică a T.pallidum. In prezent se cunosc 3 antigene cu importanţă practică pentru diagnostic:

i. Antigenul lipidic (de fapt o haptenă x)) comun tuturor treponemelor şi de asemenea prezent în unele ţesuturi umane şi animale (în special ficat şi cord), ca şi în structura altor microorganisme; datorită ubicvităţii sale determină un mare procent de rezultate fals pozitive.

ii. Antigenul proteic de grup comun treponemelor patogene şi celor comensale.

iii. Antigene proteice şi polizaharidice specifice treponemelor patogene.

b. Tipurile de anticorpi. In raport cu natura antigenelor T.pallidum, se descriu 3 tipuri de anticorpi:

i. Anticorpi antilipoidici, numiţi şi reagine, care se evidenţiază cu ajutorul cardiolipinului, extract alcoolic purificat din cord de bou. Antigenul cardiolipinic se foloseşte în reacţia de floculare tip VDRL, practicată calitativ, şi reacţia de fixare a complementului tip Kolmer, efectuată cantitativ (vezi cap.VI). Aceste reacţii, accesibile laboratorului clinic, sînt utilizate în diagnosticul de rutină al sifilisului ca reacţii de triaj.

In ultimii ani au fost imaginate microreacţii de floculare care permit un diagnostic orientativ rapid al sifilisului. Din acest

---

x) Haptena lipidică formează prin cuplare cu proteinele din structura treponemei un antigen complet faţă de care organismul reacţionează prin elaborare de anticorpi

grup de serereacţii menţionăm „Rapid Plasma Reagin Test" care foloseşte plasmă proaspătă sau ser inactivat şi „Unheated Serum Reagin" care utilizează ser neinactivat.

Prezenţa anticorpilor antilipoidici la persoane cu semne clinice sugestive de sifilis confirmă diagnosticul de boală.

In absenţa semnelor clinice sugestive de sifilis, un rezultat pozitiv al testelor cu antigen cardiolipinic poate fi urmarea unui sifilis latent sau a unor reacţii fals pozitive x). In această situaţie numai cercetarea anticorpilor antitreponemici precizează diagnosticul de boală.

ii. Anticorpii antiproteici de grup pot fi evidenţiaţi printr-o reacţie de fixare a complementului folosind un antigen proteic preparat din culturi ale tulpinii Reiter de T.phagedenis. Reacţia, care poate fi practicată alături de testele cu cardiolipin, este mai sensibilă decît acestea şi numărul rezultatelor fals pozitive mai mic dar nu exclus deoarece unele persoane supuse investigaţiei serologice pot prezenta la nivelul mucoaselor (bucală, genitală) infecţii supurative mixte cu participarea treponemelor comensale.

iii. Anticorpii specifici treponemelor patogene pot fi decelaţi cu ajutorul unui antigen preparat din T.pallidum, tulpina Nichols xx).

Reacţiile utilizate în diagnostic sînt testul de imunofluorescenţă, reacţia de hemaglutinare pasivă şi testul de imobilizare a treponemelor.

- Reacţia de imunofluorescenţă (FTA xxx)) se practică prin tehnica indirectă. Intr-un prim timp al reacţiei, antigenul, reprezentat de o suspensie omorîtă de T.pallidum, este pus în contact cu serul presupus sifilitic (anticorpii prezenţi în ser se vor cupla cu antigenul formînd complexe Ag-Ac). In a doua etapă se adaugă o antiglobulină umană marcată cu izothiocianat de fluoresceină; fixarea acesteia pe anticorpul antitreponemic legat de antigen va

---

x) Reacţii întîlnite în boli cu altă etiologie decît sifilisul (ex. malaria, lepra, colagenoze, sindromul Sjögren etc.)

xx) Tulpină de T.pallidum izolată în anul 1911 de Nichols din l.c.r. de la un bolnav cu PGP şi întreţinută de atunci prin treceri pe testicul de iepure

xxx) Fluorescent Treponemal Antibody

realiza un complex fluorescent, vizibil la microscopul cu lumină ultravioletă. Interpretarea reacţiei se face comparativ cu martori sigur pozitivi şi negativi.

Specificitatea reacţiei FTA a fost mult ameliorată în ultimii ani prin absorbţia prealabilă a serurilor de testat cu un lizat de T.Reiter, ceea ce permite rămînerea în ser numai a anticorpilor cu specificitate de tip (antiproteici şi antipolizaharidici), testul FTA-ABS x)).

Folosirea unui conjugat fluorescent monospecific anti-IgM umană a permis punerea la punct a testului IgMFTA-ABS cu deosebită valoare în stabilirea diagnosticului de sifilis congenital (se ştie că anticorpii IgM nu traversează placenta, deci prezenţa lor în serul copilului indică o infecţie „in utero").

- Reacţia de hemaglutinare pasivă (TPHA xx)) constă în aglutinarea hematiilor de oaie tanate, formolate şi sensibilizate cu un lizat de T.pallidum, de către anticorpii din serul bolnavului. Este o tehnică uşor de executat şi cu specificitate şi sensibilitate egale cu a testului FTA-ABS. Aceste considerente au determinat recomandarea sa fie ca test de depistare a sifilisului, în asociere cu un test lipoidic, fie ca test de confirmare a acestuia putînd înlocui testul FTA-ABS sau chiar pe cel de imobilizare.

- Reacţia de imobilizare a treponemelor (TPI xxx)), testul Nelson, foloseşte ca antigen o suspensie vie de T.pallidum, tulpina Nichols, proaspăt obţinută din sifilom testicular de iepure.

Principiul reacţiei constă în punerea în contact a unei suspensii vii de treponeme mobile cu serul de bolnav inactivat şi cu complement. Serul de cercetat este considerat pozitiv (adică conţine anticorpi imobilizanţi) dacă imobilizarea (urmărită în preparate umede la microscopul pe fond negru) interesează peste 50% din treponeme (citirea reacţiei se face comparativ cu un martor reprezentat de serul normal).

Testele cu antigene treponemice specifice, cu excepţia testului TPHA, se practică numai în laboratoarele de referinţă. Ele au o accesibilitate limitată de aceea se utilizează pentru elucida-

---

x) Fluorescent Treponemal Antibody Absorbtion
xx) Treponema Pallidum Hemaglutination Assay
xxx) Treponema Pallidum Immobilization

rea unor cazuri dificile de diagnosticat (de ex. bolnavi fără semne clinice de sifilis dar cu anticorpi antilipoidici prezenţi sau bolnavi cu simptome sugestive de sifilis dar fără anticorpi antilipoidici şi uneori şi fără anticorpi antiproteici de grup).

c. Dinamica anticorpilor. Diferitele categorii de anticorpi, prezenţi în serul unei persoane cu sifilis, au ritm de apariţie diferit şi o evoluţie proprie (fig.65).

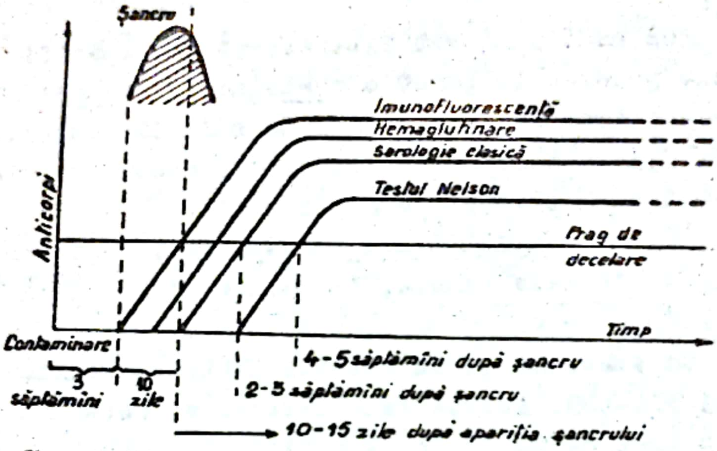


Fig. 65 Dinamica diferitelor categorii de anticorpi în raport cu apariţia şancrului. (după Thivolet, 1976.)

Primii anticorpi care apar sînt cei evidenţiaţi prin reacţia FTA-ABS, care se pozitivează la 10-15 zile de la apariţia şancrului, permiţînd un diagnostic foarte precoce. O apariţie puţin mai tardivă au anticorpii decelaţi prin TPHA. Urmează apoi pozitivarea RFC cu antigen Reiter şi apoi a reacţiilor cu antigene cardiolipinice. Ultimii anticorpi care apar sînt imobilizinele, testul TPI pozitivîndu-se în perioada secundară.

Sub influenţa tratamentului anticorpii au o dinamică descendentă, mai întîi negativîndu-se reacţiile pe bază de antigene cardiolipinice, urmează cele pe bază de antigene Reiter, şi apoi FTA-ABS, TPHA şi ultimii anticorpi care dispar sînt imobilizinele. Scăderea constantă a titrului anticorpilor serici antilipoidici sau dispariţia lor sînt criterii de eficienţă terapeutică şi vindecare a sifilisului. La bolnavii cu neurosifilis şi testele pentru anticorpii antilipoidici negative, criteriul vindecării îl constituie dispariţia anticorpilor antitreponemici specifici din l.c.r.

B. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL LEPTOSPIROZELOR

Leptospirozele sînt zooantroponoze, boli cu rezervor animal transmise accidental omului. Sursa de infecţie în natură este reprezentată în special de rozătoare (şobolani şi şoareci) care fac infecţii inaparente cu persistenţa leptospirelor în cortexul renal; eliminate prin urină timp îndelungat, acestea pot contamina apa, alimentele, solul. Unele animale domestice infectate ca porcii, bovinele, cîinii etc. pot constitui de asemenea surse de îmbolnăvire pentru om.

Agenţii cauzali ai leptospirozelor se încadrează în genul Leptospira, avînd ca specie tip L.interrogans (denumită astfel datorită formei sale de „semn de întrebare"). Există 180 serotipuri de leptospire patogene incluse în 19 grupuri serologice (tabelul XX).

Tabelul XX

Serogrupurile leptospirelor patogene, L.interrogans x)

Australis	Celledoni	Javanica
Autumnalis	Cynopteri	Panama
Ballum	Djasiman	Pomona
Bataviae	Grippotyphosa	Pyrogenes
Butembo	Hebdomadis	Sejroe
Canicola	Icterohaemorrhagiae	Shermani
		Tarassovi

x) Serogrupurile de Leptospira izolate la noi în ţară sînt, în ordinea frecvenţei: pomona, hebdomadis, icterohaemorrhagiae, canicola, bataviae, grippotyphosa

Omul se poate îmbolnăvi prin contactul direct cu animalele eliminatoare de leptospire sau indirect prin consumul de apă sau alimente contaminate cu urina animalelor infectate; apa mai poate constitui o sursă de infecţie în timpul scăldatului, pescuitului, lucrului în orezării, mine, leptospirele putînd pătrunde prin escoriaţii sau prin tegumentul macerat de umezeală. Datorită acestor modalităţi de contaminare, leptospirozele îmbracă uneori aspectul de boală profesională, afectînd în special muncitorii agricoli, din ferme animale, minierii, pescarii, lucrătorii din orezării, abatoare.

Manifestările clinice ale leptospirozelor sînt variate, mergînd de la îmbolnăviri uşoare cu aspect pseudogripal pînă la infecţii grave cu icter, sindroame hemoragice, renale şi meningeale cauzate mai ales de leptospirele din serogrupurile icterohaemorrhagiae, canicola şi bataviae (vezi tabelul XX); leptospiroza mai poate evolua şi sub formă inaparentă, imunizantă.

După o incubaţie de 3-14 zile, boala debutează cu o fază septicemică, febrilă, care durează aproximativ o săptămînă; apoi leptospirele încep să dispară din sînge şi se localizează în diferite

organe, în special ficat, rinichi, sistemul nervos central – faza organică. Consecutiv, pot apare diferite sindroame: meningeal, hepato-renal, hemoragipar (care variază de la simple hemoragii gingivale, epistaxis, congestia conjunctivelor pînă la hemoragii în organe); leptospirele pot fi eliminate prin urină începînd din a 2-a săptămînă de boală şi în convalescenţă lungi perioade de timp, leptospiruria fiind uneori intermitentă.

Diagnosticul de laborator în leptospiroză poate fi efectuat prin metode bacteriologice dar mai ales serologice.

1. <u>Diagnostic bacteriologic</u>

Produsele patologice variază în raport cu perioada de boală. Astfel, în prima săptămînă se examinează sîngele şi l.c.r. şi din a doua săptămînă urina.

a. <u>Examenul microscopic</u>. Evidenţierea leptospirelor se face în preparat umed efectuat din plasmă [x], sediment urinar [xx] şi de l.c.r. La examenul microscopic pe fond negru, leptospirele apar ca microorganisme filamentoase (6-20 µm l), foarte subţiri (0,1 µm Ø), cu spire strînse, regulate, puţin adînci şi capete îndoite în formă de cîrlig (fig.66); sînt animate de mişcări vii de rotaţie, translaţie şi flexie.

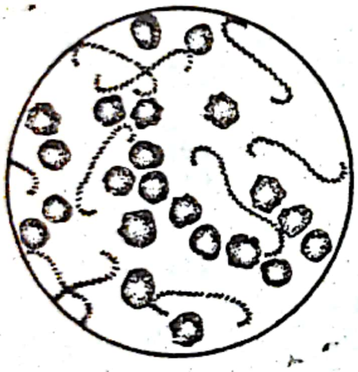


Fig.66 <u>L.interrogans</u>
Preparat din sînge

b. <u>Izolarea</u>. Deoarece leptospirele se găsesc în număr mic în sînge şi l.c.r. iar eliminarea lor prin urină este adesea intermitentă, izolarea constituie o etapă obligatorie de diagnostic. Ea se realizează prin însămînţări pe medii de cultură şi inoculări la animale de laborator care vor fi practicate, datorită lizei rapide a leptospirelor, imediat după recoltarea produselor, de preferinţă la patul bolnavului.

i. <u>Cultivarea</u> se efectuează pe mediul Korthof (soluţie salină izotonă tamponată şi cu adaos de peptonă şi ser de iepure). Sîngele şi l.c.r. se însămînţează în cantităţi crescînde pe mai multe tuburi

---

x) Sîngele, recoltat în soluţie de oxalat de potasiu 1%, este menţinut la temperatura camerei pentru sedimentarea hematiilor, după care din lichidul supernatant se depun cîteva picături între lamă şi lamelă.

xx) Urina este alcalinizată prin administrare prealabilă de bicarbonat de sodiu bolnavului, în ajunul prelevării probei

Scanned with OKEN Scanner

cu mediu (începînd de la o picătură în primul tub) pentru anularea efectului bacteriostatic al umorilor. In cazul urinii se vor folosi medii cu adaos de neomicină (10-25 ug/ml) sau 5-fluorouracil (200-400 ug/ml) care inhibă dezvoltarea bacteriilor de contaminare.

După însămînțare, mediile vor fi incubate la 28-30°C, în condiții de aerobioză și la întuneric. Prezența leptospirelor în cultură se urmărește prin examen microscopic pe fond negru, la intervale de 5 zile, timp de 2 luni.

ii. Inocularea se practică, în paralel cu însămînțarea, la cobai de 100-200 g (de preferință albi), pe cale intraperitoneală (sînge, l.c.r.) sau subcutanată (urină). Animalele se termometrizează zilnic. In prima zi de febră se recoltează sînge din cord pentru hemocultură și examen microscopic pe fond negru. Animalele infectate mor în decurs de 7-14 zile iar la necropsie se constată icter, hemoragii cutanate și în viscere (ficat, rinichi, pulmoni). Leptospirele pot fi evidențiate prin examen microscopic pe fond negru și culturi din sînge și omogenate din ficat și rinichi.

c. Identificarea antigenică. Leptospira izolată va fi identificată cu seruri imune de referință prin reacția de aglutinare - liză cu citire microscopică.

d. Sensibilitatea la antibiotice. Leptospirele sînt natural sensibile la multe antibiotice și în special la penicilină și tetracicline x) cu care se efectuează tratamentul în leptospiroze, fără practicarea antibiogramei.

2. Diagnostic serologic

Serodiagnosticul reprezintă metoda cea mai folosită de diagnostic. Examenul serologic se efectuează în dinamică pe 2 probe de ser folosind reacția de fixare a complementului (RFC), completată cu reacția de aglutinare- liză (RAL).

RFC se practică cu antigen biflexa Patoc xx), fiind accesibilă laboratoarelor clinice. Ea permite stabilirea unui diagnostic precoce de leptospiroză (anticorpii fixatori de complement apar

---

x) Penicilina este antibioticul de elecție care va fi înlocuit cu tetracicline la persoanele sensibilizate

xx) Antigen preparat din Leptospira biflexa, specie care reunește leptospirele saprofite, cu habitat natural în ape și soluri umede

la 3-5 zile de boală), fără a putea preciza însă serogrupul tulpinii infectante.

RAL x) folosește ca antigen culturi vii de leptospire patogene, de aceea se utilizează numai în laboratoarele de referință. Este o reacție foarte sensibilă care permite stabilirea serogrupului și serotipului tulpinii izolate. Ea va fi practicată după a 20-a zi de la debutul bolii deoarece în primele 2-3 săptămîni coaglutininele pentru serotipurile heterologe depășesc în titru aglutininele corespunzătoare serotipului infectant.

---

x) Principiul reacției constă în a pune în contact pe lamă antigenele (culturi de diferite serotipuri de leptospire) cu diluții variate de ser de bolnav (de la 1:50 la 1:10.000). Citirea aglutinării și lizei bacteriilor se face la microscopul cu fond negru

XIX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE MICOPLASME

Micoplasmele sînt microorganisme procariote încadrate în clasa Mollicutes (mollis=moale; cutis=înveliș). Ele au drept caractere comune: absența peretelui celular rigid, dimensiunea foarte mică (0,125-0,250 /um Ø) și posibilitatea de a cultiva „in vitro" pe medii acelulare, cultura fiind inhibată de anticorpii specifici. Primele 2 caractere, enunțate mai sus, conferă micoplasmelor unele proprietăți care le diferențiază de bacteriile propriu-zise: plasticitate morfologică (coci, cocobacili, forme filamentoase, uneori ramificate), rezistență la antibiotice cu acțiune de perete (ex. peniciline) și posibilitate de trecere prin membrane filtrante care rețin bacteriile.

Micoplasmele cu habitat uman se încadrează în ordinul Mycoplasmatales, familia Mycoplasmataceae, genurile Mycoplasma și Ureaplasma. Unele specii sînt patogene pentru om: M.pneumoniae, altele condiționat patogene: M.hominis, M.fermentans x), U.urealyticum iar altele comensale pe mucoasa bucală, cu patogenitate nedemonstrată: M.salivarium, M.orale, M.bucale, M.faucium.

M.salivarium este specia de micoplasmă care predomină în placa dentară, precum și în pungile parodontale la persoanele cu parodontite marginale.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL PNEUMONIEI ATIPICE PRIMARE

Agentul cauzal al pneumoniei atipice primare (PAP) este M.pneumoniae. Diagnosticul PAP poate fi suspectat clinic și radio-

---

x) U.urealyticum și M.hominis pot cauza infecții ale tractusului urogenital: uretrite, prostatite, salpingite și abcese pelvine iar M.fermentans a fost implicată, de unii autori, în etiologia artritei reumatoide. Toate aceste 3 specii fac parte din microbiota mucoaselor urogenitală și faringiană

logic, etiologia certă fiind însă stabilită numai prin examen de laborator, bacteriologic dar mai ales serologic.

1. Diagnostic bacteriologic

Diagnosticul bacteriologic constă în izolarea şi identificarea *M.pneumoniae* în spută recoltată de la bolnav.

a. Examenul microscopic al frotiurilor din spută colorate Gram este lipsit de valoare diagnostică din cauza pleomorfismului accentuat al acestor microorganisme.

b. Izolarea se realizează pe medii complexe lichide, solide sau difazice, pe bază de infuzie de cord de bou cu adaos de ser de cal (aport de colesterol) şi extract proaspăt de drojdie de bere (aport de vitamine din grupul B), glucoză şi ca indicator de pH: roşu fenol. Selectivitatea mediilor este conferită de conţinutul în acetat de thaliu (concentraţie finală 0,05%) şi penicilină (concentraţie finală 1000 U/ml), care împiedică dezvoltarea florei bacteriene de asociaţie; în mediul difazic se adaugă în plus albastru de metilen (0,001%) care inhibă creşterea celorlalte specii de micoplasme respiratorii.

Incubarea se face la 37°C în condiţii de aerobioză, timp de 2-3 săptămîni.

Pozitivarea culturilor în mediul lichid se evidenţiază prin virarea culorii mediului în galben (datorită fermentării glucozei), moment în care se fac treceri pe medii solide. In cazul mediului difazic, creşterea *M.pneumoniae* se traduce prin schimbarea culorii iniţiale a mediului din albastru-verzui în galben (reducerea albastrului de metilen la incolor plus virarea roşului fenol în galben consecutiv fermentării glucozei).

Pe medii solide apar colonii foarte mici (100-300 um Ø), rotunde, cu suprafaţa granulară, aspect predominant de „mură", aderente la mediu, vizibile numai la microscop. Pentru diferenţierea coloniilor de *Mycoplasma* de alte colonii bacteriene se utilizează colorația Dienes [x]. Colorantul se pune pe o lamă care se aplică cu faţa în jos pe suprafaţa mediului cu colonii. Amprentele din colonii, acoperite cu o lamelă, se examinează imediat şi după 20-30 minute la microscopul cu imersie: coloniile de *Myco-*

---

[x] Colorantul conţine albastru de metilen, azur II, maltoză şi CO_3Na_2 în apă distilată

plasma se colorează în albastru, colorație ce se menține și după 20-30 minute, în timp ce coloniile celorlalte bacterii apar decolorate la a 2-a examinare.

c. Identificarea tulpinii izolate ca M.pneumoniae se realizează pe baza caracterelor de cultură și biochimice (tabelul XXI).

d. Sensibilitatea la antibiotice. M.pneumoniae, ca și celelalte micoplasme, sînt în special sensibile la tetracicline și eritromicine dar rezistente la peniciline și la alte antibiotice cu acțiune asupra peretelui bacterian.

2. Diagnostic serologic

In diagnosticul serologic al PAP se folosesc atît reacții specifice cît și reacții nespecifice.

a. Reacțiile serologice specifice: reacția de fixare a complementului și reacția de hemaglutinare pasivă (RHAP) utilizează antigene preparate din M.pneumoniae [x]. In cazul RHAP, antigenul este adsorbit pe suprafața hematiilor de oaie tanate sau tratate cu glutaraldehidă. Deoarece aceste reacții sînt frecvent pozitive la persoane normale, se consideră semnificativă pentru diagnostic o creștere a titrului anticorpilor de cel puțin 4x în cursul evoluției bolii (examinare în dinamică pe 2 probe de ser, recoltate la interval de 10-14 zile).

b. Reacțiile serologice nespecifice se folosesc cînd nu dispunem de antigene Mycoplasma. Din această categorie face parte reacția de hemaglutinare la rece (4°C) a hematiilor de om grup O, pozitivă la aproximativ 50% din bolnavii cu PAP. Crioaglutininele ar fi autoanticorpi dovadă că reacția de hemaglutinare la rece este pozitivă și în alte boli: hepatice, de sînge, ca și în unele infecții virale (gripă, rujeolă, rubeolă etc.) și parazitare (malarie etc.). De aceea interpretarea rezultatelor reacției de hemaglutinare la rece se va face în contextul simptomatologiei clinice, precum și a creșterii titrului hemaglutinant de cel puțin 4x la examinarea în dinamică a serului.

---

[x] Antigenul Mycoplasma este inclus în „bateria de antigene" pentru diagnosticul prin RFC a infecțiilor respiratorii acute. Această baterie conține antigenele agenților etiologici posibili ai PAP: Mycoplasma, virusuri, chlamidii și rickettsii

Tabelul XXI **CARACTERISTICI ALE UNOR SPECII DE MYCOPLASMA IMPLICATE IN INFECTII LA OM**

CARACTERISTICI		M.PNEUMONIAE	M.HOMINIS	M.FERMENTANS	U.UREALYTICUM
Cultivare	aerobă	+	-	-	-
	anaerobă	-	+	+	+
Rata de creștere		lent (6–10 ⟶ 30 zile)	moderat	moderat	rapid (2 — 3 zile)
Aspectul coloniilor		granular „mură"	„ou – ochi"	„ou – ochi"	foarte mici (10 – 30 μm ø)
Metaboli - zarea	glucozei	+	-	+	-
	ureei	-	-	-	+
	argininei	-	+	+	-
Hemoliza tip β a hematiilor de cobai		+	-	-	+
Reducerea TTC* în aerobioză		+	-	-	-
Dezvoltarea pe medii cu albastru de metilen (0,001%)		+	-	-	-

* CLORURA DE TRIFENILTETRAZOLIU

XX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL CANDIDOZEI BUCALE

Candidozele sînt boli cauzate de microorganisme eucariote, şi anume de fungi dimorfi x) din genul Candida. Din cele peste 35 specii ale genului xx), cea mai importantă din punct de vedere a patogenităţii pentru om este C.albicans, un comensal al mucoaselor (bucală, intestinală, vaginală) şi tegumentului la unii indivizi.

Datorită habitatului frecvent al candidelor pe mucoasele şi tegumentul omului, candidozele au cel mai adesea o origine endogenă, apariţia lor fiind favorizată de o serie de factori: teren deficitar (prematuritate, afecţiuni maligne, tuberculoză, carenţe imunologice etc.), folosirea nejudicioasă a antibioticelor, în special cu spectru larg (ex. tetraciclinele), care modifică echilibrul microbian normal al mucoaselor, boli endocrine (ex. diabet, hipotiroidie, insuficienţă suprarenală), dezechilibre hormonale (în cursul sarcinii, prin administrare de oestroprogestative, anticoncepţionale etc.), afecţiuni ale glandelor salivare care determină hipo- sau asialie etc.

Semnalarea frecventă a candidozelor după tratamente medicamentoase prelungite, instrumentaţii terapeutice sau exploratorii efectuate în condiţii de nerespectare a regulilor de asepsie, transplant de organe etc., face ca aceste infecţii să îmbrace adesea aspectul de „boală iatrogenă".

Din punct de vedere clinic, candidozele se pot prezenta sub formă de infecţii superficiale ale tegumentului (intertrigo marilor pliuri, interdigital), fanerelor (onixis) şi mucoaselor (stomatite, vaginite), infecţii profunde, viscerale (pulmonare, renale, digestive etc.) şi septicemii, urmate uneori de localizări secundare meningeale, endocardice, oculare, cerebrale etc.

---

x) Fungi care se dezvoltă sub 2 forme: levurică şi miceliană

xx) C.stellatoidea, C.tropicalis, C.pseudotropicalis, C.guillermondii, C.krusei, C.parakrusei etc.

Candidoza bucală, descrisă în trecut la copiii mici, distrofici, se poate observa în prezent la orice vîrstă. Ea se manifestă, cel mai adesea, sub formă de stomatită, cunoscută sub numele de muguet. Debutul este marcat printr-o congestie intensă a mucoasei bucale (în special jugală) şi a limbii, însoţită de senzaţie de arsură şi uscăciune a gurii. După 2-3 zile, pe fondul eritematos apar depozite mci albicioase, iniţial izolate, de mărimea unui cap de boldă şi apoi confluente, cu aspectul unor pete de iaurt, care uneori aderă la mucoasă; bolnavul prezintă o uşoară disfagie iar la copilul mic se observă tulburări de sugere.

In absenţa tratamentului pot surveni 2 complicaţii: cronicizare, cu evoluţie în pusee, sau extinderea infecţiei către esofag, intestin.

In afară de stomatită, Candida mai poate determina infecţii localizate sub formă de glosită mediană (limba este uşor hipertrofiată, depapilată, lucioasă, colorată în roşu-intens, cu depozite albicioase; leziunile interesează numai mijlocul feţei dorsale a limbii, înaintea V-ului lingual) sau uranita (bolta palatină este eritematoasă şi cu mici granulaţii albicioase); de asemenea cheilite angulare (mucoasa comisurii labiale este fisurată, dureroasă şi acoperită de cruste).

Diagnostic micologic

Diagnosticul de laborator în candidoze se bazează în special pe izolarea şi identificarea levurilor din diferite produse patologice (spută, exsudate, urină, sînge, l.c.r. etc.). In candidoza bucală se vor recolta depozitele albicioase de la nivelul mucoasei, printr-o uşoară raclare cu ajutorul unui tampon de vată steril.

a. Examenul microscopic direct. Frotiurile, efectuate cu tamponul, se colorează Gram. La examenul microscopic se observă celule levurice, rotunde sau ovalare, de 2-5 μm, adesea înmugurite - blastospori, gram-pozitive. Blastosporii pot forma scurte pseudomicelii (fig.67).

Prezenţa concomitentă a celulelor burjonate şi a pseudomiceliilor permite diagnosticul de gen Candida.

Elementele levurice vor fi apreciate cantitativ în raport cu flora bacteriană existentă în frotiu.

Scanned with OKEN Scanner

Fig.67 C.albicans
Frotiu din produs

Deoarece candidele se pot găsi comensale la nivelul mucoasei bucale, examenul cultural va completa obligator frotiul atît pentru identificarea speciei de Candida (cunoscîndu-se faptul că specia albicans este cel mai frecvent implicată în infecţii), cît şi pentru confirmarea rolului său etiologic.

b. Izolarea. Produsul recoltat va fi însămînţat pe 2 eprubete cu mediu Sabouraud solid x), adiţionat cu cloramfenicol 0,5 g‰ pentru inhibarea dezvoltării contaminanţilor bacterieni; incubarea se va face în paralel la 28 şi 37°C.

c. Identificarea. Candida izolată va fi identificată pe baza următoarelor criterii:

- caractere morfotinctoriale. Frotiul efectuat din cultura de pe mediul Sabouraud, colorat Gram, evidenţiază de obicei numai celule levurice cu morfologia descrisă;

- caractere de cultură. Pe mediul Sabouraud, după 24-48 ore de termostazie la 28°C, apar colonii mari, alb-gălbui, cremoase, strălucitoare, de tip S. Dezvoltarea candidelor şi la 37°C constituie un criteriu suplimentar de patogenitate.

Pentru stabilirea diagnosticului de specie albicans este necesară însămînţarea levurii izolate pe un mediu sărac în principii nutritive, de ex. geloza PCB xx). După 24 ore de incubare la 28°C se prelevă un mic fragment de mediu care se striveşte între lamă şi lamelă şi apoi se examinează la microscop; se observă pseudomicelii, purtînd la joncţiune grupuri de blastospori, precum şi chlamidospori - forme de rezistenţă: celule rotunde, de 7-10 µm diametru, cu perete gros, izolate sau grupate, situate terminal sau lateral în raport cu pseudomiceliul (fig.68).

Triada morfologică reprezentată de: blastospori, pseudo-

---

x) Geloză glucozată 20‰

xx) Mediul PCB: Pomme de terre-Carotte-Bile

Scanned with OKEN Scanner

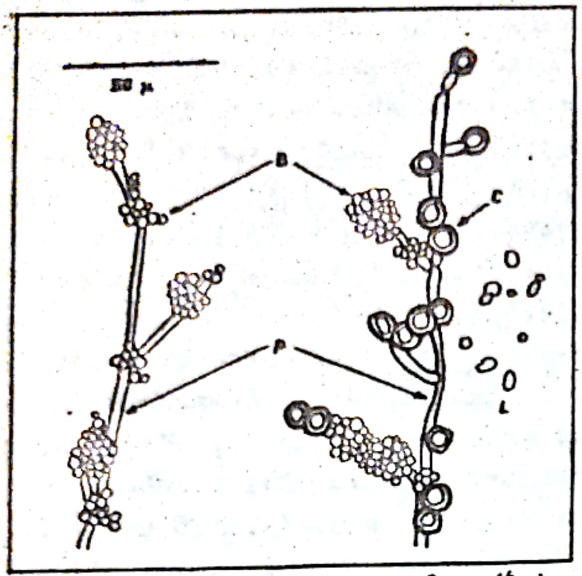


Fig. 68 Morfologia C.albicans în culturi pe mediul P.C.B.
L - celule levurice; P - pseudomiceli; B - blastospori; C - chlamidospori. (după Drouhet, 1974)

miceli și chlamidospori sferici, este patognomonică pentru diagnosticul de specie albicans.

O metodă rapidă de identificare a C.albicans, care dă însă rezultate pozitive și în cazul unor tulpini de C.stellatoidea, este testul de filamentare în ser a lui Taschdjian (fig.69): se atinge cu ansa o colonie dintr-o cultură de 24 ore pe mediul Sabouraud (fără cloramfenicol) și se emulsionează în 0,5 ml ser uman sau animal (cal, bou), repartizat într-un tub de aglutinare. Amestecul se incubează 3 ore la termostat, la 37°C și apoi se efectuează un preparat umed care se examinează la microscopul cu obiectiv uscat: testul pozitiv se traduce prin apariția unor expansiuni tubulare, în „deget de mănușă", denumite „tubi germinativi", care emerg din celulele levurice. Diferențierea speciei albicans de stellatoidea poate fi ușor făcută prin cercetarea asimilării zaharozei (tabelul XXII);

Fig.69 C.albicans
Filamentarea în ser

- caractere biochimice. Dacă levura izolată nu formează chlamidospori pe mediul PCB și nu filamentează în ser înseamnă că este o altă specie de Candida decît albicans și va fi identificată pe baza unor teste biochimice: asimilarea zaharurilor (auxonograma), fermentarea zaharurilor (zimograma), reducerea tetrazoliului etc. (vezi tabelul XXII);

Tabelul XXII. Unele caractere morfologice, de cultură, biochimice şi de patogenitate ale speciilor de Candida mai frecvent izolate din infecţii de la om

Specia	Formarea chlamidosporilor sferici pe mediul P.C.B.	Filamentarea în ser	Dezvoltarea pe mediul Sabouraud cu Actidion 0,59‰ x)	Reducerea tetrazoliului	Asimilarea zaharurilor						Fermentarea zaharurilor					Patogenitatea pentru iepure
					glucoză	maltoză	lactoză	zaharoză	galactoză	rafinoză	glucoză	zaharoză	maltoză	lactoză	rafinoză	
C. albicans	+	+	+	–(colonii albe)	+	+	–	+	+	–	AG	A	AG	–	–	+
C. stellatoidea	–	±	+	+(" roz)	+	+	–	–	+	–	AG	A	AG	–	–	–
C. tropicalis	–	–	–	+(" roş-violet)	+	+	–	+	+	–	AG	AG	AG	–	–	–
C. pseudotropicalis	–	–	+	+(" roz)	+	–	+	+	+	+	AG	AG	–	AG	AG	–
C. guillermondii	–	–	+	+(" roşii)	+	+	–	+	+	+	AG	AG	–	–	AG	–
C. krusei	–	–	–	–(" albe)	+	–	–	–	–	–	AG	–	–	–	–	–
C. parakrusei	–	–	–	+(" roşii)	+	+	–	+	+	–	AG	–	–	–	–	–

± inconstant x) Actidion – cicloheximidă A = acid ; AG = acid + gaz

- caractere de patogenitate. Avînd în vedere prezenţa frecventă a candidelor în stare de comensalism pe mucoasa bucală, pentru implicarea etiologică în infecţie a tulpinii izolate se va ţine seama de următoarele criterii:

- prezenţa celulelor levurice în număr mare şi eventual şi a pseudomiceliilor la examenul microscopic direct;
- foarte numeroase colonii în cultură;
- identificarea speciei albicans.

Rezultatele examenului micologic vor fi de asemenea corroborate cu manifestarea clinică respectivă.

Atunci cînd este posibil, patogenitatea tulpinii de C.albicans izolată va fi demonstrată şi prin inoculare la iepure, animalul cel mai sensibil: se injectează 1 ml dintr-o suspensie de cultură 1% în soluţie salină izotonă, în vena marginală a urechii la un iepure de 1-2 Kg. Animalul moare, în 5-7 zile, cu microabcese în rinichi din care poate fi reizolată tulpina.

d. Sensibilitatea la medicamente antifungice. C.albicans este sensibilă la: amfotericină B, nistatin, 5-fluorocitozină şi unii compuşi imidazolici (econazol, miconazol, ketoconazol etc.). Tratamentul se va face pe bază de antibiogramă.

NOTIUNI PRACTICE DE VIROLOGIE

Scanned with OKEN Scanner

XXI. PRINCIPII GENERALE ALE DIAGNOSTICULUI DE LABORATOR IN VIROZE

Recoltarea şi transportul produselor patologice

Diagnosticul de laborator în viroze se bazează, în general, pe aceleaşi principii ca în bolile bacteriene dar cu unele particularităţi legate de stadiile de evoluţie ale infecţiei virale. Astfel în perioada de debut şi în primele 24-48 ore de boală, corespunzătoare fazei de multiplicare intensă şi de invazie a virusului în organism, diagnosticul de laborator va fi orientat spre evidenţierea agentului viral agresor în produsele patologice recoltate de la bolnav (fig.70). In perioada de stare a bolii, concomitent cu modificările morfopatologice survenite în organe şi ţesuturi ca urmare a replicării virusului, ceea ce permite uneori efectuarea unui diagnostic histopatologic, apare şi reacţia de apărare a organismului tradusă prin elaborarea activă de anticorpi serici. Pe măsura instalării stării de imunitate, virusul este eliminat

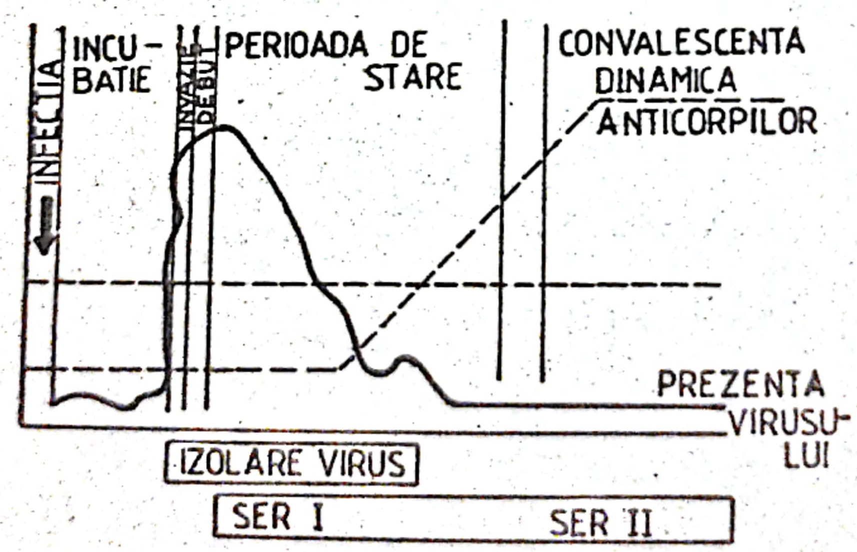


Fig.70. Momentul optim pentru recoltarea produselor patologice şi a serului în viroze

din organism de aceea diagnosticul de laborator în perioada de stare şi convalescenţă se bazează pe evidenţierea apariţiei sau creşterii titrului anticorpilor serici specifici.

Practic, diagnosticul de laborator al infecţiilor virale poate fi efectuat prin 2 metode principale: diagnosticul virologic şi diagnosticul serologic, la care se adaugă, în anumite situaţii, examenul histopatologic x).

1. Diagnostic virologic

Diagnosticul virologic, practicat în primele zile de boală, constă în izolarea şi identificarea virusului în produsele patologice recoltate de la bolnav sau de la cadavru.

Examenul virologic permite un diagnostic etiologic numai dacă izolarea virusului s-a făcut din produse normal sterile sau dacă virusul izolat nu este circulant în teritoriu (ex. virusul variolic, virusurile gripale). In celelalte cazuri, simpla izolare a unui virus nu este suficientă pentru stabilirea diagnosticului deoarece din produsele patologice recoltate de la bolnav se pot izola virusuri latente care nu au nici o legătură cu boala cercetată şi chiar gazdele de laborator pot fi parazitate de astfel de virusuri care se evidenţiază în cursul inoculărilor; de asemeni, uneori de la acelaşi bolnav se pot izola virusuri multiple (ex. enterovirusuri), dintre care doar unul este cauza infecţiei actuale. In aceste situaţii numai serodiagnosticul poate să stabilească cu certitudine dacă virusul izolat sau care din virusurile izolate este agentul etiologic al sindromului clinic prezent la bolnavul investigat.

2. Diagnostic serologic

Serodiagnosticul constă în punerea în evidenţă în serul de cercetat a anticorpilor (IgG sau/şi IgM) specifici faţă de virusul izolat sau faţă de un antigen cunoscut, ceea ce permite stabilirea cu certitudine a etiologiei unei infecţii virale aparente sau in-

---

x) Examenul histopatologic se execută pe frotiuri sau secţiuni de ţesuturi şi organe, recoltate de obicei la necropsie (mult mai rar prin biopsie) cu scopul de a evidenţia modificările morfopatologice produse de infecţia virală: incluzii intranucleare sau intracitoplasmatice, leziuni de tip inflamator sau degenerativ. In rare cazuri aceste modificări sînt foarte caracteristice şi permit precizarea diagnosticului (de ex. prezenţa incluziilor Babeş-Negri în citoplasma neuronilor din cornul lui Ammon în rabie)

aparente. Examenele serologice vor fi practicate în dinamică, pe cel puţin 2 probe de ser titrate simultan, una „precoce" (ser I), recoltată în primele zile de la debutul bolii şi alta „tardivă" (ser II), prelevată în convalescenţă (sau după 10-14 zile). Etiologia virală a infecţiei este demonstrată atunci cînd anticorpii sînt absenţi în serul I dar apar în serul II sau cînd titrul lor creşte de cel puţin 4 ori în serul II faţă de serul I.

Deoarece unele sindroame clinice ca rinofaringita, pneumonia, meningita, gastroenterita etc. pot fi cauzate de numeroase virusuri, pentru stabilirea etiologiei acestora se practică un diagnostic serologic diferenţial, prin folosirea de „baterii" de antigene corespunzătoare virusurilor ce pot determina sindromul respectiv. Reacţia serologică efectuată în aceste condiţii va indica antigenul faţă de care au apărut anticorpii sau a crescut titrul acestora, definind astfel infecţia recentă, şi în acelaşi timp va evidenţia existenţa unei eventuale amprente imunologice (acelaşi titru al anticorpilor în serurile I şi II) sau a unei stări de receptivitate la infecţie (absenţa anticorpilor faţă de un anumit virus).

Serodiagnosticul poate aduce, de asemenea, confirmarea etiologiei unei epidemii (viroză respiratorie, enteroviroză): creşterea titrului anticorpilor la majoritatea persoanelor bolnave faţă de un anumit virus îl desemnează ca agent epidemigen.

In concluzie trebuie reţinut faptul că dintre cele 2 categorii de metode de diagnostic a bolilor virale: virologice şi serologice se acordă prioritate serodiagnosticului care, efectuat corect, este obligator şi suficient pentru a preciza etiologia marii majorităţi a virozelor.

Metodele clasice de diagnostic a bolilor virale deşi sensibile şi specifice sînt laborioase, costisitoare şi au un caracter tardiv, de aceea ele tind să fie înlocuite treptat cu metode rapide, mai simple ca execuţie şi care permit afirmarea etiologiei virale într-un timp foarte scurt (cîteva ore). Aceste metode rapide, care pot fi folosite atît pentru evidenţierea virusurilor sau a antigenelor virale cît şi pentru decelarea anticorpilor specifici în serul de cercetat (vezi cap.XXII şi XXIII), se bazează pe utilizarea anticorpilor marcaţi (cu fluorocrom, radionuclide, feritină sau enzime) şi a imunoelectronomicroscopiei.

Scanned with OKEN Scanner

Recoltarea, transportul şi conservarea produselor patologice pentru examenul virologic

Un diagnostic de laborator corect depinde, în mare măsură, de modul de recoltare şi transport a produselor patologice prelevate de la bolnav. Natura probelor variază în raport cu manifestările clinice ale infecţiei virale, sediul multiplicării maxime a virusului şi căile obişnuite de eliminare a acestuia din organism (tabelul XXIII).

Tabelul XXIII. Produsele patologice recoltate pentru izolarea virusurilor în unele infecţii virale

Infecţii virale, Agenţi etiologici	Natura probelor pentru izolarea virusurilor: Cazuri clinice	Natura probelor pentru izolarea virusurilor: Postmortem sau biopsie
<u>Infecţii ale tractusului respirator superior</u>		
Rhinovirusuri Virusuri paragripale Virus respirator sinciţial	exsudat faringian, secreţii nasale	-
Adenovirusuri Enterovirusuri Reovirusuri	exsudat faringian, materii fecale	-
<u>Infecţii ale tractusului respirator inferior</u>		
Virusuri gripale: A, B Virusuri paragripale Adenovirusuri Virus respirator sinciţial	exsudat faringian, spută	pulmon
<u>Infecţii cutanate şi ale mucoaselor</u>		
<u>Cu exantem maculo-papular:</u>		
Rujeola - Virusul rujeolic Rubeola - Virusul rubeolic	exsudat faringian, sînge	-
Enterovirusuri	exsudat faringian, materii fecale	-
<u>Veziculare:</u>		
Herpes. Virusul Herpes simplex 1 şi 2	lichid vezicular	ficat, splină, pulmon

Tabelul XXIII (continuare)

Vaccina. Virusul vaccinia Varicela – zoster. Virusul Varicella-zoster	lichid vezicular	ficat, splină, pulmon
Enterovirusuri	exsudat faringian, materii fecale, lichid vezicular	–
Gastroenterite infantile		
Rotavirus	materii fecale	fragmente de intestin
Infecții ale SNC		
– acute (meningite, encefalite)		
Virusul urlian	exsudat faringian, l.c.r., urină	creier
Virusul Herpes simplex	exsudat faringian, l.c.r.	
Virusul rabic	salivă	
Enterovirusuri	materii fecale, l.c.r.	
Virusul coriomeningitei limfocitare	sînge, l.c.r.	
Arbovirusuri	sînge, l.c.r.	
– cronice (boli degenerative)		
Virusul rujeolic (panencefalita sclerozantă subacută)		creier
Virusul rubeolic (panencefalita progresivă)		
Anomalii congenitale		
Virusul citomegalic	urină, exsudat faringian	rinichi, pulmon ş.a.
Virusul rubeolic	exsudat faringian, l.c.r.	gl.limfatici, splină, pulmon ş.a.
Parotidita epidemică		
Virusul urlian	exsudat faringian, salivă, urină	–
Hepatitele virale:		
– cu virus A	materii fecale	–
– cu virus B	sînge x)	–

x) In hepatita B virusul n-a fost încă izolat dar sîngele este produsul folosit pentru evidențierea antigenelor virale

Scanned with OKEN Scanner

Recoltarea produselor patologice se practică, în general, după aceleași tehnici ca și în cazul infecțiilor bacteriene (vezi cap.III) dar există unele particularități privind transportul, prelucrarea și conservarea acestora în vederea păstrării infectivității virusurilor x). Astfel, imediat după recoltare, produsul se introduce într-un flacon de sticlă cu dop atexic care conține 2-5 ml mediu conservant de transport, obișnuit mediul Hanks (tampon fosfat salin cu 0,25-0,50% serumalbumină bovină) care, prin conținutul bogat în proteine, săruri și acțiune de tamponare, menține infectivitatea virusului. La mediu se adaugă antibiotice (penicilină, streptomicină și nistatin) care omoară sau inhibă flora bacteriană eventual existentă în produs.

Recipientele cu produsul patologic vor fi etichetate prin lipirea unei benzi de leucoplast pe care se notează cu creion negru: numele pacientului, vîrsta, produsul recoltat și data recoltării. Produsul va fi însoțit și de o fișă în care vor fi menționate datele clinice și epidemiologice.

Dacă transportul la laboratorul de virologie durează mai mult de cîteva ore, probele vor fi refrigerate sau congelate prin introducerea recipientelor respective în termosuri cu amestec de gheață și sare de bucătărie (0°C)și respectiv amestec de zăpadă carbonică și alcool (-20°C); expediere prin delegat special.

Sîngele și fragmentele de organe sau țesuturi fac excepție de la metodele generale de conservare și transport a produselor patologice.

Sîngele, recoltat în faza de viremie a bolii, este defibrinat prin agitare în balon cu perle de sticlă sau recoltat pe anticoagulante (ex. heparină); transportul probei se face la 4°C (nu este permisă congelarea sîngelui).

Fragmentele de organe sau țesuturi, recoltate la necropsie sau prin puncție biopsică vor fi introduse în glicerină soluție 50% tamponată sterilă și menținute la 4°C pînă la prelucrare. Pentru examenul histopatologic, glicerina este înlocuită cu o soluție fixatoare (de ex. formolul 10%).

---

x) Pentru majoritatea virusurilor, infecțiozitatea unei suspensii virale se reduce cu 50% în cîteva ore la temperatura camerii, în cîteva zile la 4°C și în cîteva luni la -70°C

XXII. DIAGNOSTICUL VIROLOGIC

Diagnosticul virologic urmărește evidențierea, izolarea și identificarea virusurilor din produse patologice.

A. METODE RAPIDE DE DIAGNOSTIC

Metodele rapide de diagnostic se bazează pe evidențierea virusului infectant sau a antigenelor virale specifice direct în produsul patologic, permițînd afirmarea unei etiologii virale într-un interval de timp scurt, 2-3 ore.

1. Examenul la microscopul optic. Examinarea la microscopul optic a frotiurilor din produse patologice permite, după colorații speciale, evidențierea rapidă a corpusculilor virali de talie mare (ex. poxvirusuri) sau relevă unele modificări caracteristice ale infecției virale cum ar fi prezența în celulele nervoase din cornul lui Ammon în rabie a incluziilor citoplasmatice oxifile, corpusculii Babeș-Negri.

2. Examenul la microscopul electronic (ME). Examinarea la ME a frotiurilor din produse patologice sau a amprentelor din organe poate stabili un diagnostic rapid, de certitudine, bazat pe aspectul caracteristic al virionului (ex. virus variolic, adenovirus, coronavirus).

Specificitatea si sensibilitatea ME este mult mărită prin folosirea unui ser imun specific, imunoelectronomicroscopia (IME), ce determină agregarea virionilor care, după fixare și „colorare negativă" cu tetroxid de osmiu, pot fi identificați la microscopul electronic. IME permite un diagnostic rapid în gastroenteritele infantile cu Rotavirus, hepatitele virale A și B, infecțiile acute respiratorii etc.

3. Metodele cu anticorpi marcați. In funcție de trasorul folosit, metodele cu anticorpi marcați sînt: imunofluorescența, imunoperoxidaza și radioimunotestarea.

a. Imunofluorescenţa (IF),(marcaj cu izothiocianat de fluoresceină), poate fi utilizată în varianta directă (procedeu într-un timp care foloseşte un anticorp marcat specific faţă de un anumit virus) şi varianta indirectă (procedeu în doi timpi care foloseşte un anticorp specific faţă de un virus, preparat pe animal, a cărui legare la antigen este evidenţiată cu un ser imun marcat cu antiglobulină umană (vezi cap.V).

IF este o metodă pretenţioasă din punct de vedere tehnic şi cere din partea examinatorului o bună experienţă pentru a diferenţia fluorescenţa specifică de cea nespecifică proprie unor structurilor examinate.

In virologie, IF permite identificarea rapidă a unui număr mare de virusuri: gripal A şi B, respirator sinciţial, rujeolic, rubeolic, urlian, herpetic etc. în frotiuri din produse patologice sau în amprente din fragmente biopsice sau necropsice. De asemenea cu ajutorul IF pot fi decelate unele antigene virale în leucocite şi macrofage.

b. Imunoperoxidaza, testul ELISA x) (marcaj cu o enzimă, cel mai frecvent peroxidaza de hrean) este o metodă valoroasă, simplă ca execuţie şi cel puţin la fel de sensibilă ca şi IF. Ea constă în adsorbţia (imobilizarea) anticorpului corespunzător antigenului de identificat pe o suprafaţă solidă (ex. suprafaţa internă a unei eprubete, mărgele din plastic) (fig.71, a). Acest imunosorbent, pus în contact cu proba de testat, reţine antigenul specific (fig.71,b).

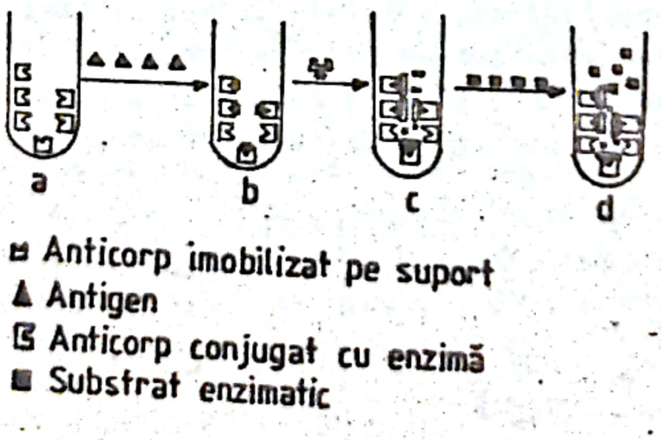


Fig.71 Principiul reacţiei de imunoperoxidază cu dublu anticorp pentru decelarea antigenului

---

x) Enzyme Linked Immunosorbent Assay

La complexul antigen-aticorp format se adaugă un conjugat imunoenzimatic (anticorp marcat cu peroxidază) (fig.71, c) şi în final substratul pentru enzimă (ex. benzidină) (fig.71, d). Citirea reacţiei se face pe baza schimbării de culoare (apreciată spectrofotometric), consecutiv degradării enzimatice a substratului: de ex. sub acţiunea peroxidazei, benzidina este oxidată într-un produs albastru-brun vizibil la microscopul optic (preparatul poate fi examinat şi la microscopul electronic); intensitatea culorii este proporţională cu cantitatea de antigen din proba examinată.

Dintre aplicaţiile practice ale testului ELISA menţionăm: identificarea nucleocapsidelor rujeolice în creier la bolnavi cu panencefalită sclerozantă subacută, diagnosticul rapid al rabiei prin evidenţierea virusului rabic în amprente din zone de elecţie din creier, diagnosticul rapid al infecţiei genitale cu virusurile herpetice pe celule escoriate de pe colul uterin, evidenţierea virusului Epstein-Barr în celulele din limfomul lui Burkitt, diagnosticul rapid al virozelor respiratorii (virusuri gripale, virus respirator sinciţial, adenovirus) pe celule descuamate din mucoasa tractusului respirator etc.

c. Radioimunotestarea (RIA) x), poate fi realizată prin mai multe metode. Testul direct, necompetitiv, cu dublu anticorp (sau tehnica „in sandwich") se bazează pe utilizarea unui ser marcat radioactiv care evidenţiază antigenul din proba de testat cuplat în prealabil cu anticorpul specific imobilizat pe un suport solid (ex. mărgea din polistiren, peretele intern al unei eprubete) (fig. 72, A, B). Citirea reacţiei se face pe baza măsurării radioactivităţii (numărul de impulsuri/min.) reţinută în faza solidă. In varianta descrisă, radioactivitatea este direct proporţională cu can-

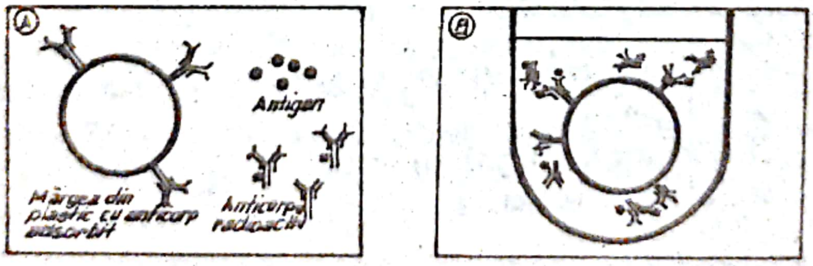


Fig.72 Principiul testului RIA cu dublu anticorp

x) Radio Immuno Assay

titatea de antigen prezentă în proba cercetată.

Tehnicile RIA sînt în special utilizate pentru decelarea AgHBs și anti-HBc în vederea triajului donatorilor de singe și diagnosticul hepatitei B dar au inconvenientul că necesită laboratoare special dotate pentru manipularea reactivilor marcați.

B. IZOLAREA VIRUSURILOR

Deoarece virusurile sînt replicate exclusiv de celulele pe care le parazitează, izolarea lor se realizează numai prin inocularea produselor patologice la o gazdă vie:

- culturi de celule „in vitro",
- culturi de organe,
- embrioni de găină în dezvoltare și
- animale de laborator sensibile.

In vederea inoculării, produsele patologice vor fi prelucrate x). In acest scop ele vor fi decongelate rapid la un jet de apă de robinet și apoi suspensionate în mediu conservant (prin agitare cu perle de sticlă, mojarare cu pulbere de cuarț steril etc., în funcție de natura probei). In continuare vor fi centrifugate 15 minute la 2000 r.p.m. (suspensiile de materii fecale 20 minute la 10.000 r.p.m. la 4°C) pentru îndepărtarea resturilor celulare iar supernatantul tratat cu antibiotice xx) va servi la inoculare.

Produsele patologice prelucrate care urmează a fi păstrate în laborator pentru repetarea examenelor (reizolarea virusului) vor fi congelate brusc prin introducerea recipientului (eprubetă sau fiolă) într-un amestec de zăpadă carbonică și alcool; conservare la -20 sau -70°C.

1. Culturi de celule „in vitro"

Culturile de celule „in vitro" reprezintă gazda de laborator cea mai larg utilizată pentru izolarea virusurilor. Ele sînt obținute din diferite țesuturi umane sau animale, embrionare sau adulte, normale sau neoplazice și menținute vii cu posibilități de multiplicare și intensă activitate metabolică în condiții adecvate de nu-

---

x) Fac excepție sîngele și l.c.r. care fiind produse normal sterile se inoculează ca atare

xx) Dacă într-un produs patologic se urmărește nu numai izolarea virusurilor, ci și evidențierea bacteriilor, rickettsiilor sau micoplasmelor, probele vor fi introduse la recoltare în mediu conservant fără antibiotice, antibioticele urmînd a fi adăugate la prelucrarea probelor în laborator

triţie, temperatură şi pH. Există 3 tipuri de celule folosite pentru replicarea virusurilor:

a. Culturi primare de celule care se prepară extemporaneu din ţesuturi proaspăt recoltate de la om sau animale. In funcţie de tipul de celule predominant în cultură, ele pot fi de tip epitelial sau fibroblastic. Au dezavantajul că nu pot fi subcultivate decît de maximum 5-6 ori, apoi mor.

Cele mai utilizate în practica medicală sînt culturile primare de rinichi de maimuţă Rhesus.

b. Tulpini de celule diploide care se obţin din subcultivarea celulelor fibroblastice. Ca şi culturile primare îşi păstrează cariotipul diploid normal. Supravieţuiesc timp de 40-50 generaţii.

Cea mai folosită este tulpina de celule diploide umane WI-38 (Wistar-38) derivată din fibroblaşti de embrion uman (pulmon).

c. Linii permanente de celule care sînt cel mai frecvent obţinute din ţesut neoplazic şi au un potenţial de multiplicare nelimitat „in vitro". Ele pot proveni şi din mutaţii survenite în cursul subcultivării celulelor diploide.

Mai frecvent utilizată este linia de celule HeLa derivată dintr-un carcinom cervical uman. Alte linii sînt: HEp-2 (carcinom laringean uman), BHK-21 (rinichi de hamster), MDCK (rinichi de cîine), KB (epiteliom al bolţii palatine) etc.

Comparativ cu culturile primare, liniile de celule au o receptivitate mai redusă pentru unele virusuri datorită „ştergerii" unor caractere pe care le poseda celula „in vivo", consecutiv repetatelor subcultivări „in vitro". De aceea o serie de virusuri sînt izolate din produse patologice în culturi primare de celule sau în culturi diploide şi adaptate ulterior la linii de celule.

Culturile de celule pot fi utilizate pentru:
- izolarea unor virusuri din produse patologice,
- identificarea antigenică a virusului izolat,
- prepararea de antigene virale pentru serodiagnostic, şi
- prepararea de vaccinuri virale.

Principiul tehnicii de preparare a culturilor de celule primare. In vederea preparării culturilor de celule este nevoie de sticlărie neutră, pregătită după o tehnică specială, medii nutritive care să ofere celulelor condiţii optime de creştere şi multipli-

care „in vitro"(medii de creştere) şi respectiv de supravieţuire (medii de întreţinere), respectarea strictă a metodei lucrului aseptic etc.

Fragmentul de ţesut sau organ este secţionat şi tratat cu o enzimă proteolitică (tripsină) pentru separarea celulelor. Suspensia de celule astfel obţinută se ajustează la o anumită concentraţie, se introduce în diferite recipiente (tuburi, flacoane sau cutii Petri sterile) şi se acoperă cu mediul de creştere, tamponat şi conţinînd 5-10% ser fetal. Recipientele, prevăzute cu dop de cauciuc atoxic, sînt incubate, în poziţie orizontală, la termostat la 37°C. Celulele se ataşează pe sticlă şi în momentul în care formează un strat monocelular (film celular) pot fi infectate cu virusul de replicat.

<u>Inocularea culturilor de celule cu produsul patologic</u>. Filmul celular, spălat de mediul de creştere, este acoperit cu o cantitate de produs patologic (<u>inoculum</u>) prelucrat corespunzător. Cultura de celule astfel inoculată este menţinută, în poziţie orizontală, 60 minute la 37°C pentru adsorbţia virusului pe receptorii celulari; apoi excesul de <u>inoculum</u> se îndepărtează şi se adaugă mediul de întreţinere. Se continuă incubarea culturii inoculate, urmărindu-se zilnic cu lupa pentru a surprinde modificările determinate de multiplicarea virusului. Aceste modificări pot fi urmărite prin mai multe metode:

a. <u>Examenul microscopic direct</u> al culturii de celule care poate evidenţia un proces de degenerare cauzat de replicarea virusului, proces denumit efect citopatic (ECP) (fig.73). De ex. entero-

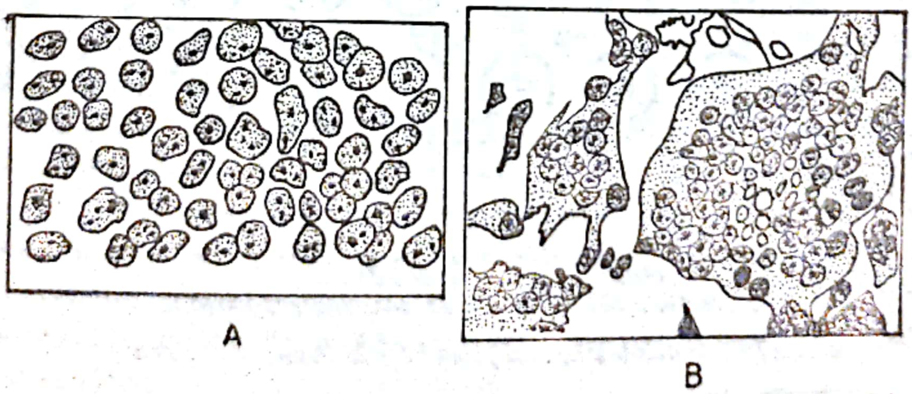


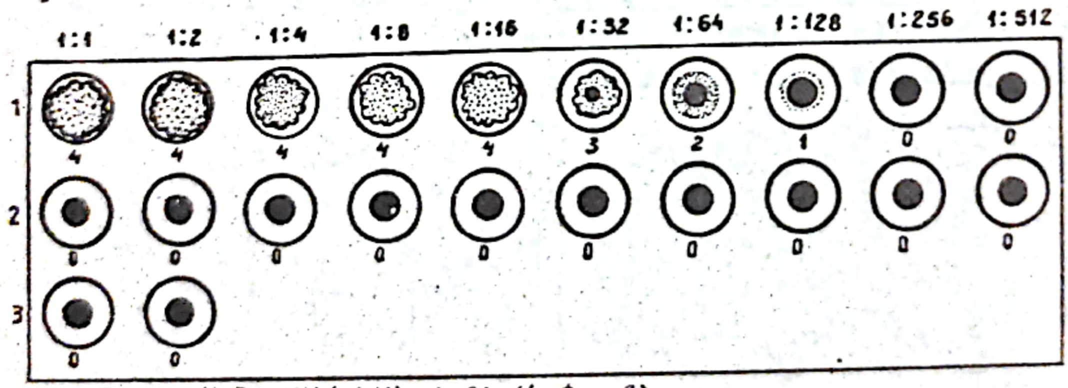
Fig.73 Efect citopatic în culturi de celule. A=cultură de celule KB neinfectată. B=efect citopatic (formarea de sincitii) în culturi de celule KB, indus de virusul respirator sinciţial

virusurile determină rotunjirea și desprinderea de pe sticlă a celulelor, virusurile rujeolic, herpetic și respirator sincițial determină formarea de celule gigante multinucleate (sinciții) ca urmare a alterării membranelor cu fuzionarea mai multor celule într-o masă citoplasmatică unică (vezi fig.73).

b. Fenomenul de interferență virală ce poate constitui o metodă indirectă de decelare într-un produs patologic a unui virus necitopatogen (ex. virusul rubeolic) prin suprainfectarea culturii de celule cu un virus citopatogen cunoscut (ex. Coxsackie A_9). Dacă primul virus inoculat a fost replicat în celule, nu mai apare ECP al celui de-al doilea virus care a fost astfel interferat.

c. Reacția de hemaglutinare (RH). Aplicată pentru evidențierea virusurilor cu proprietăți hemaglutinante (ex. virusurile gripale, rujeolic, rubeolic, urlian), RH permite și măsurarea (titrarea) cantității de virus replicat. Capacitatea hemaglutinantă a virusului constă în aglutinarea hematiilor în suspensie, provenite de la diferite specii de mamifere sau păsări.

RH se practică pe plăci din material plastic cu godeuri, efectuîndu-se diluții duble din suspensia virală (antigen) x) reprezentată de mediul nutritiv al culturii de celule, în volum de 0,25 ml (sau 0,025 ml în micrometodă), peste care se adaugă, în același volum, suspensia de hematii indicată; hematiile sînt verificate printr-un martor hematii pentru a nu aglutina spontan în diluent (soluție salină izotonă) (fig.74). Placa se agită prin mișcări cir-



1. RH pozitivă ; TH (1UH) = 1:64 (lectura 2)
2. RH negativă (lectura 0). ; 3. Martor suspensie hematii.

Fig.74 Schema reacției de hemaglutinare

---

x) In RH, antigenul poate fi reprezentat și de lichidele amniotic și alantoidian ale oului de găină embrionat infectat cu virus, de omogenate de organe sau suspensii purificate de virus

culare în plan orizontal şi se lasă în repaos, la temperatura camerei, 60-90 minute, pînă la sedimentarea totală a hematiilor de la martor (buton roşu compact).

Citirea şi interpretarea reacţiei

Reacţie negativă = sedimentarea completă a hematiilor sub forma unui buton roşu ca la martor.

Reacţie pozitivă = hematiile aglutinează sub forma unor agregate granulare. Diferitele grade de intensitate ale hemaglutinării se notează convenţional cu cifre:

4 = 100% hematii aglutinate (depunerea acestora sub formă de umbrelă);

3 = 75% hematii aglutinate şi restul hematiilor sedimentate (urme de buton);

2 = 50% hematii aglutinate şi 50% sedimentate (buton incomplet);

1 = 25% hematii aglutinate şi restul sedimentate (buton mai puţin compact);

0 = absenţa hemaglutinării.

Diluţia cea mai mare de antigen (suspensie virală) care determină aglutinarea a 50% din hematii (lectura 2) este considerată titrul hemaglutinant (TH) al virusului care corespunde la concentraţia de 1 unitate hemaglutinantă (1 UH). In exemplul din fig.74, TH (sau 1 UH) este reprezentat de diluţia de antigen 1:64.

d. Testul de hemadsorbţie. Dacă cultura de celule inoculată cu produs patologic conţine un virus hemaglutinant care s-a multiplicat, celulele infectate pot adsorbi hematii de la diferite specii animale. Examinarea la microscopul optic va evidenţia în acest caz prezenţa hematiilor grupate în „rozetă" în jurul unor celule din cultură infectate cu virus.

e. Coloraţia imunofluorescentă decelează virusul matur sau antigenele virale în celulele infectate.

f. Formarea de incluzii virale, intranucleare (herpesvirus, adenovirus, poliovirus), intracitoplasmatice (virusuri gripale, paragripale, rabic) sau intracitoplasmatice şi intranucleare (virusul Varicella-zoster) poate fi evidenţiată prin coloraţii speciale la microscopul optic.

2. Culturi de organe

Culturile realizate din fragmente mici de organe (trahee, cornete nasale, bronhii, intestin subțire proximal) permit cultivarea unor virusuri respiratorii (virusuri gripale, coronavirusuri) sau enterice (rotavirusuri).

3. Embrioni de găină în dezvoltare

Inocularea în ouăle de găină embrionate se folosește pentru izolarea unor virusuri (ex. virusurile gripale, urlian, herpetic), prepararea de vaccinuri (ex. vaccin gripal), și prepararea de antigene virale pentru serodiagnostic.

Produsele patologice se inoculează pe diferite căi (fig.75).

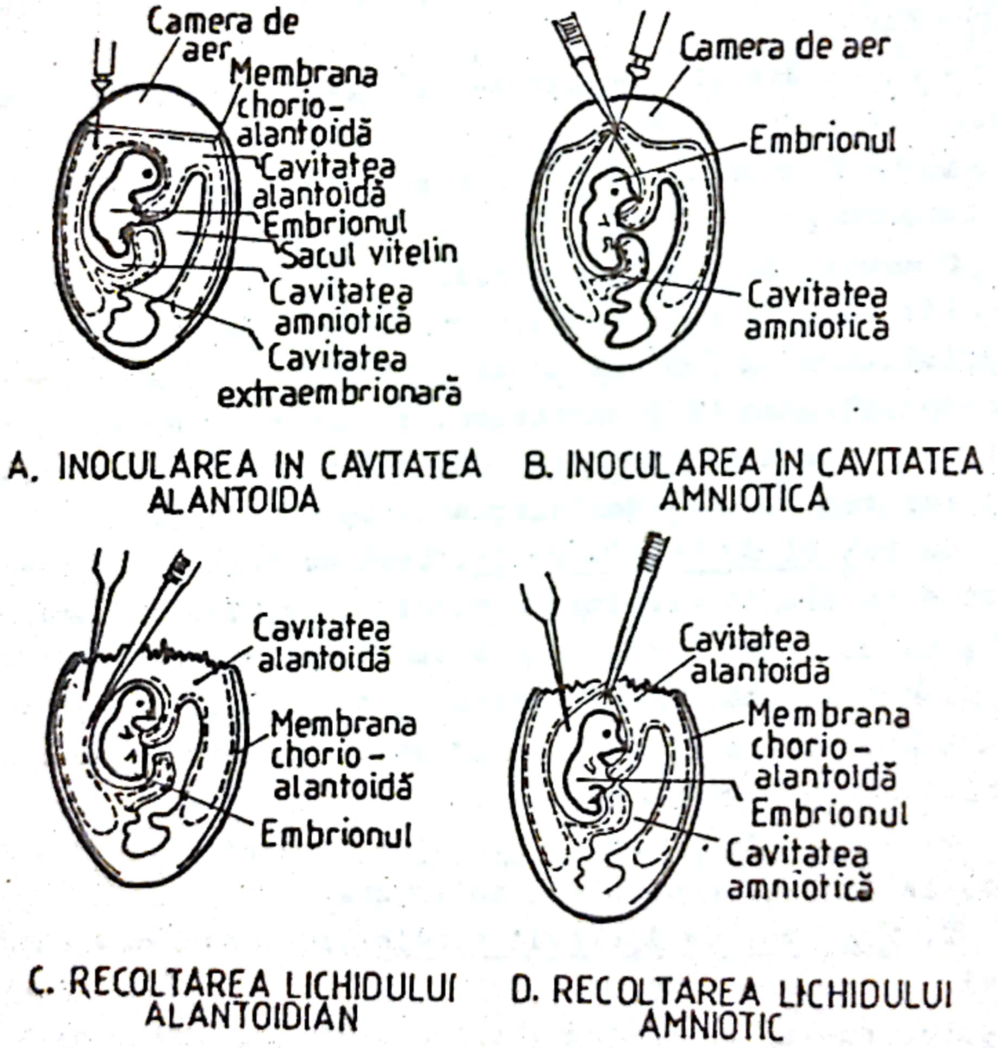


Fig.75 Izolarea virusurilor pe ouă de găină embrionate. Sedii de inoculare a virusurilor (A,B) și tehnici de recoltare a lichidelor embrionare (C,D)

Inoculările pe ou se vor efectua în boxe sterile, respectîndu-se metodica lucrului aseptic (mască, halat, instrumentar steril). Ouăle embrionate pregătite pentru inoculare vor fi examinate la ovoscop (examinare prin transiluminare în camera obscură) marcînd pe coajă limita camerei cu aer și poziția embrionului (disc opac cu mișcări pulsatile). Inocularea se face la embrioni de vîrste diferite în raport cu calea de inoculare: 7-11 zile pentru inocularea pe membrana chorioalantoidă, 7 zile pentru inocularea în cavitatea amniotică, 5-7 zile pentru inocularea în sacul vitelin etc. După inoculare, ouăle se incubează la 35°C, timp de 2-5 zile, pentru multiplicarea virusurilor; apoi embrionii se sacrifică prin menținerea ouălor peste noapte la 4°C (procedeu care evită hemoragiile în timpul prelevărilor) după care se recoltează lichidele amniotic, alantoidian sau învelișurile embrionare în funcție de virusul urmărit.

Prezența virusului în produsul inoculat poate cauza moartea embrionului (ex. virusurile encefalitice), apariția unor leziuni veziculo-pustuloase (poxuri) pe membrana chorioalantoidă (ex. virusurile variolic, vaccinia, herpetice) (fig.76) sau a unor proprietăți noi pe care le dobîndesc lichidele embrionare infectate (ex. capacitatea hemaglutinantă a lichidelor amniotic și alantoidian după inocularea unor virusuri hemaglutinante: virusurile gripale, paragripale, urlian etc.).

Fig.76 Dezvoltarea virusului Herpes simplex pe membrana chorioalantoidă a oului de găină embrionat. A=membrană normală; B=membrană cu poxuri produse de virus.

4. Animale de laborator

Utilizarea animalelor de laborator drept gazdă pentru repli-

carea virusurilor este în prezent limitată pentru mai multe motive:

- reactivitate neuniformă în funcție de particularitățile individuale ale animalului;

- prezența infecțiilor latente cu diferite virusuri care se evidențiază cu ocazia inoculării virusului uman, ceea ce cauzează dificultăți în interpretarea rezultatelor bolii experimentale;

- existența amprentelor imunologice față de virusuri proprii încît, în cazul inoculării unui virus uman, înrudit antigenic cu cel propriu, animalul nu mai răspunde fiind imun;

- costul ridicat comparativ cu acela al culturilor de celule sau a ouălor embrionate etc.

Totuși, pentru unele virusuri (ex. virusurile Coxsackie, virusul rabic, arbovirusuri, virusul choriomeningitei limfocitare), animalele de laborator continuă să fie o gazdă aproape exclusivă. Infecția virală se evidențiază prin apariția unei boli experimentale caracteristice (ex. paralizii de tip flasc sau spastic la șoarecele nou-născut în cazul virusurilor Coxsackie, manifestări de encefalită la șoarecele adult produse de arbovirusuri) și/sau prezența de leziuni histopatologice de tip inflamator, degenerativ sau a incluziilor virale (ex. corpusculii Babeș-Negri în citoplasma neuronilor din cornul lui Ammon în rabie).

C. IDENTIFICAREA VIRUSURILOR

Identificarea virusului izolat se bazează pe studiul complex al proprietăților sale (morfologia și dimensiunile corpusculilor virali, comportarea față de diferiți agenți fizici sau chimici, ECP caracteristic, reproducerea infecției experimentale, evidențierea leziunilor histopatologice etc.) dar în mod obișnuit se recurge la identificarea serologică cu ajutorul reacțiilor antigen-anticorp. Redăm mai jos cîteva din aceste reacții.

1. Reacția de fixare a complementului (RFC). Antigenele, preparate pe baza virusului izolat, puse în prezența serului imun specific cunoscut, formează complexe antigen-anticorp care fixează complementul.

2. Reacția de neutralizare (RN) „in vitro". Virusul izolat este pus în prezența unor seruri imune cunoscute și apoi amestecurile de virus + ser imun sînt inoculate la gazde receptive (culturi de celule, ouă embrionate, animale de laborator). Dacă virusul

de identificat corespunde unuia din serurile imune, atunci el este neutralizat iar amestecul inoculat la gazda receptivă nu va mai produce modificările caracteristice infecţiei virale respective.

3. Reacţia de inhibare a hemaglutinării (RIH). Această reacţie este utilizată pentru identificarea antigenică a virusurilor care posedă hemaglutinină (ex. virusurile gripale, paragripale, rujeolic, rubeolic, urlian). Principiul RIH constă în neutralizarea hemaglutininei virale de către anticorpii specifici din serul imun cunoscut ceea ce are ca urmare împiedicarea producerii hemaglutinării caracteristice.

Elementele reacţiei:

- virusul de identificat, care este mai întîi titrat prin RH pentru stabilirea titrului hemaglutinant (TH) sau a unităţii hemaglutinante (1 UH), în RIH fiind necesar un antigen de 8 ori mai concentrat (8 UH);

- serurile imune cunoscute, preparate pe animale de laborator, care sînt în prealabil tratate pentru îndepărtarea inhibitorilor nespecifici x) care pot determina reacţii fals pozitive.

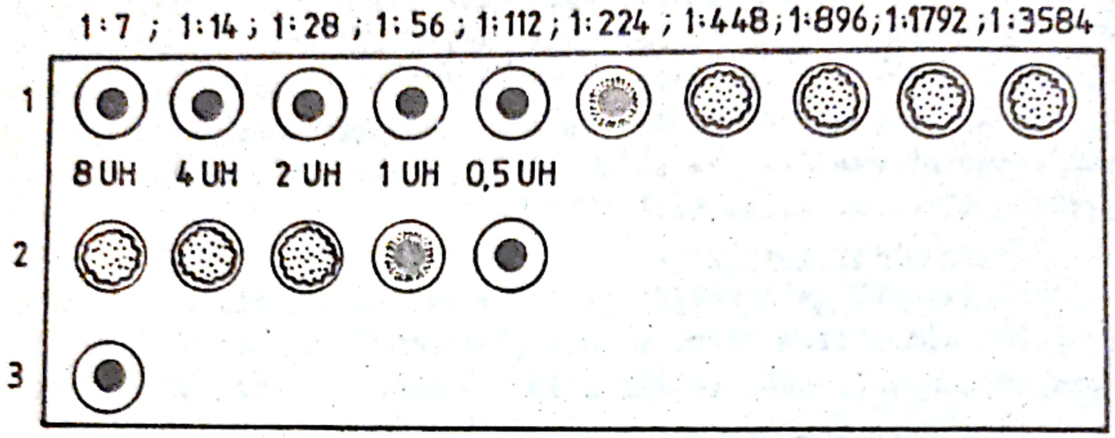
Tehnica RIH (fig.77). RIH se efectuează în plăci cu godeuri din material plastic. Intr-un şir de godeuri se realizează diluţii duble seriate din serul imun cunoscut în volum de 0,25 ml (0,025 ml în microtehnică). Apoi în fiecare godeu se distribuie cîte un volum (0,25 ml) de antigen 8 UH şi cîte un volum din suspensia de hematii faţă de care virusul de identificat îşi manifestă proprietatea hemaglutinantă (de ex. pentru virusul gripal se vor utiliza hematii de om grup O, de cobai sau de pasăre). In reacţie se folosesc 2 martori: martor hematii (un volum suspensie hematii şi un volum diluent) pentru verificarea calităţii hematiilor şi un martor antigen, pentru verificarea celor 8 UH. In acest scop se fac 5 diluţii duble seriate (în 5 godeuri) pornind de la antigenul considerat 8 UH, peste care se adaugă un volum din suspensia de hematii.

Placa se agită în plan orizontal şi se lasă în repaos la temperatura camerei pînă la sedimentarea totală a hematiilor de la martorul suspensiei de hematii (lectura O).

---

x) Inhibitorii nespecifici sînt proteine serice, altele decît anticorpii specifici, care pot fi îndepărtate prin tratarea serurilor cu periodat de K (KIO_4 M/90)

Dacă la martorul antigen, lectura 2 (1 UH) se face la nivelul godeului al 4-lea, luînd în considerație diluțiile care s-au efectuat înseamnă că în primul godeu se află 8 UH. Dacă martorii sînt corespunzători se trece la citirea reacției propriu-zise.



1. Diluții duble seriate din serul imun de referință la care s-a adăugat antigenul 8 UH și suspensia de hematii. Titrul inhibitor al hemaglutinării (TIH)=1:224; 2. Martor antigen 8 UH; 3. Martor suspensie hematii.

Fig.77 Schema reacției de inhibare a hemaglutinării (RIH) pentru identificarea virusului

<u>Interpretarea reacției</u>: dacă virusul de identificat corespunde imunologic anticorpilor din serul imun cunoscut, hemaglutinarea va fi inhibată prin neutralizarea hemaglutininei de către anticorpi. Diluția cea mai mare de ser care inhibă hemaglutinarea în proporție de 50% trebuie să corespundă titrului inhibitor (TIH) cunoscut al serului de referință. In exemplul din fig.77, TIH = 1:224. RIH negativă se traduce prin prezența hemaglutinării.

4. <u>Reacția de inhibare a hemadsorbției</u> (RIHAd). Această reacție deși mai puțin sensibilă decît RIH se aplică atunci cînd titrul hemaglutinant al virusului este prea mic pentru a se obține cele 8 UH necesare în RIH.

RIHAd se practică în culturile de celule în care s-a izolat virusul. Se adaugă serul imun cunoscut (care se tratează pentru îndepărtarea inhibitorilor nespecifici ca și în RIH) și după menținere 30 minute la temperatura camerei se adaugă și suspensia de hematii. Culturile se mențin din nou 30 minute la temperatura camerei și apoi se examinează la microscop pentru prezența hemadsorbției. Virusul este identificat de serul care inhibă hemadsorbția.

Scanned with OKEN Scanner

XXIII. DIAGNOSTICUL SEROLOGIC

Serodiagnosticul permite stabilirea cu certitudine a unei infecții virale aparente sau inaparente, precum și decelarea stării de imunitate a populației dobîndită în mod natural (prin infecție virală) sau artificial (prin vaccinare).

Evidențierea anticorpilor (IgG sau/și IgM) poate fi efectuată prin numeroase reacții serologice: RFC, RIH, RN, IF, IDD, ELISA, RIA etc., dar cele mai utilizate în laboratorul de diagnostic curent sînt RFC, RIH și metoda imunoperoxidazei.

1. Reacția de fixare a complementului (RFC) se realizează în plăci din material plastic cu godeuri, după tehnica propusă de Bradstred și Taylor. Reactivii (serul de cercetat, antigenele virale, complementul, cuplul hemolitic) sînt folosiți în volume de 0,1 ml (semimicrotehnică) sau de 0,025 ml (microtehnică), la diluții optime determinate prin titrări anterioare; pentru asigurarea specificității reacției se folosesc o serie de martori (vezi cap.VI).

Cantitatea anticorpilor fixatori de complement din serul investigat este exprimată prin titrul serului: cea mai mare diluție de ser care a determinat depunerea a 50% din hematiile sensibilizate, restul hematiilor fiind lizate (notare cu ++ sau cifra 2).

Examenele serologice se practică în dinamică, pe cel puțin 2 probe de ser: una recoltată în faza acută a bolii, serul I și alta în convalescență, serul II. Criteriul unui diagnostic pozitiv de infecție virală îl constituie evidențierea creșterii semnificative de cel puțin 4x a titrului anticorpilor fixatori de complement în serul II față de serul I.

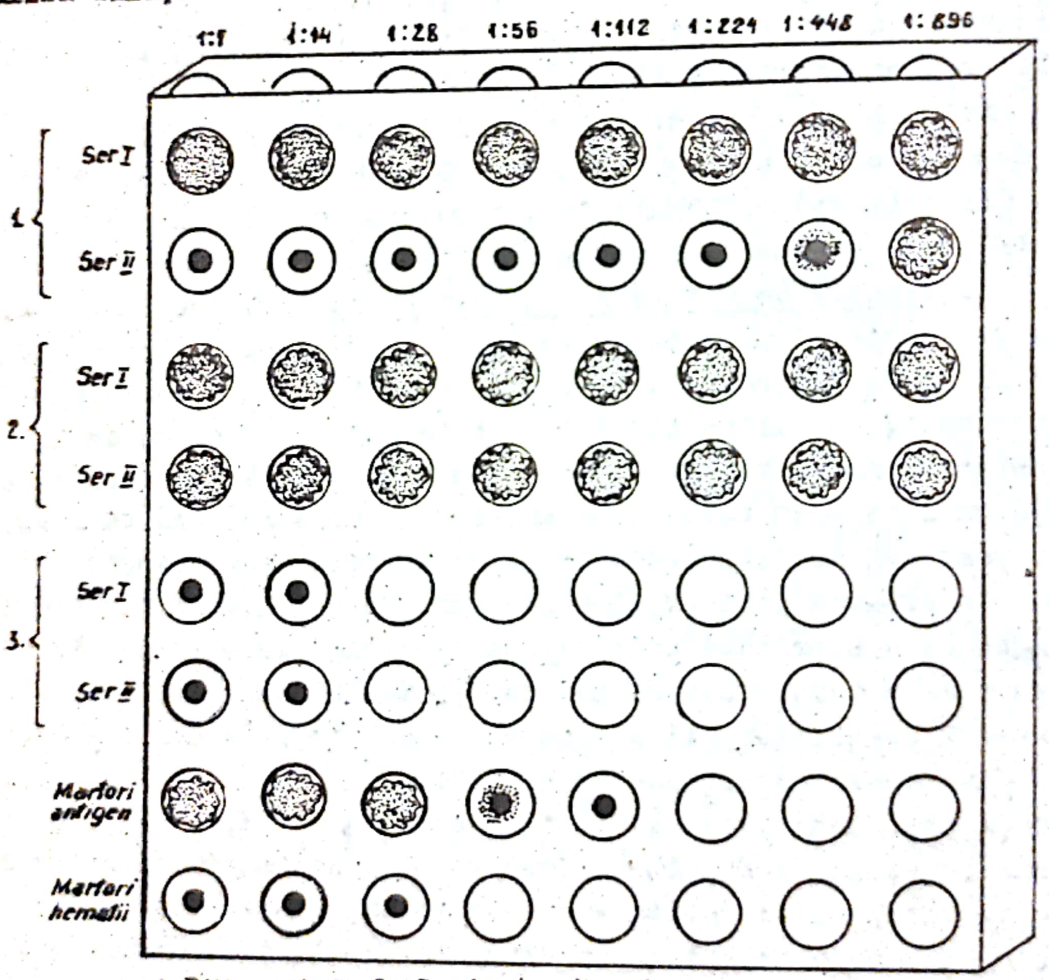
RFC este folosită în diagnosticul serologic al virozelor respiratorii acute (ex. gripă, adenoviroze, infecții cu virusuri paragripale), rujeolei, infecției herpetice etc.

2. Reacția de inhibare a hemaglutinării (RIH) evidențiază

apariţia şi creşterea, în serul bolnavilor, a anticorpilor inhibitori ai hemaglutinării specifici virusului implicat în infecţia virală respectivă.

Tehnica RIH utilizată în diagnosticul serologic este aceeaşi ca şi tehnica descrisă la identificarea serologică a virusurilor cu cîteva precizări:

- serurile de cercetat recoltate de la bolnavi, convalescenţi sau aparent sănătoşi (în caz de sondaje epidemiologice) vor fi tratate pentru îndepărtarea inhibitorilor nespecifici şi apoi se vor realiza diluţii seriate conform schemei din fig.78;



1. RIH pozitivă; Ser I = absenţa anticorpilor; Ser II TAc = 1:448 = infecţie recentă.
2. RIH negativă = stare de receptivitate.
3. TAc Ser I = TAc Ser II = stare de imunitate.

Fig.78 Schema reacţiei de inhibare a hemaglutinării aplicată în diagnosticul serologic

- antigenul cunoscut, care conține 8 UH, va fi distribuit în toate godeurile plăcii în același volum.

Interpretarea reacției:

- creșterea titrului anticorpilor inhibitori ai hemaglutinării în serul II de cel puțin 4x față de serul I permite stabilirea diagnosticului de infecție recentă (vezi fig.78);

- absența anticorpilor inhibitori (deci prezența hemaglutinării) indică o stare de receptivitate față de virusul (antigenul) folosit în reacție;

- un titru egal de anticorpi în ambele seruri dovedește o stare de imunitate (boală în antecedente sau vaccinare) (vezi fig. 78).

RIH este utilizată în serodiagnosticul gripei, rubeolei, rujeolei, parotiditei epidemice etc.

3. Metoda imunoperoxidazei (tehnica micro-ELISA) constituie de asemeni o reacție foarte utilă în serodiagnosticul de rutină al unor infecții virale, practicîndu-se în plăci de polistiren cu godeuri.

Principiul reacției: antigenul viral cunoscut este adsorbit pe godeurile plăcii; din serul de cercetat se fac diluții duble începînd de la diluția 1:8, care se repartizează apoi în godeuri. După incubarea plăcii cîteva ore la termostat (37°C), la amestecul antigen + diluția de ser se adaugă antiglobulină umană marcată cu peroxidază și apoi substratul pentru enzimă. Degradarea enzimatică a substratului este proporțională cu concentrația anticorpilor din proba de testat și se apreciază pe baza schimbării de culoare vizibilă cu ochiul liber sau la spectrofotometru.

Titrul anticorpilor este reprezentat de ultima diluție de ser la care se mai observă colorația.

Micro-ELISA a dat bune rezultate în serodiagnosticul rubeolei.

Pentru urgentarea diagnosticului, RFC, RIH și metoda imunoperoxidazei pot fi executate pe o probă unică de ser cu evidențierea IgM (răspuns imun primar). Aceasta se poate realiza prin tratarea serului investigat cu agenți reducători ca 2-mercaptoetanol (2-ME), care distrug funcția anticorp a IgM dar nu afectează funcția anticorp a IgG. Reacția se practică în paralel cu ser tratat

și netratat (martor). Dacă în proba de ser tratată cu 2-ME titrul anticorpilor scade comparativ cu martorul, înseamnă că în reacție sînt implicați anticorpii IgM.

Urmărirea în dinamică, pe 2 probe de ser, a titrului anticorpilor, separat pentru IgM și IgG, permite diferențierea unei infecții virale recente, prin evidențierea prezenței IgM, de răspunsul imun secundar caracterizat preponderent prin elaborarea de IgG.

XXIV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VIROZELOR RESPIRATORII

Aproximativ 90% din infecţiile acute respiratorii au o etiologie virală. Ponderea deosebită a virozelor respiratorii se datorește numărului mare al agenţilor cauzali, fiecare cu numeroase serotipuri (tabelul XXIV), variaţiei antigenice a unor virusuri (ex. virusurile gripale) şi absenţei măsurilor de profilaxie specifică (cu excepţia gripei).

Tabelul XXIV. Virusuri implicate în infecţii acute ale tractusului respirator

Grup	Serotipuri	Sindroame clinice
Virusuri gripale	A,B,C	gripă; traheo-bronşită; pneumonie primară
Virusuri paragripale	1-4	guturai; crup (laringo-traheo-bronşită) şi pneumonie la copii
Virus respirator sinciţial	1	bronşiolită şi pneumonie la sugar; guturai la copii mai mari
Rhinovirusuri	> 120	guturai epidemic
Adenovirusuri	1-7, 14-21	faringită; crup şi pneumonie la copilul mic
Coronavirusuri	?	guturai
Echovirusuri x)	11 şi 20	guturai
Virusuri Coxsackie x)	A21,B3	guturai
Reovirusuri x)	1-3	faringite

x) Virusuri care vor fi descrise cu ocazia altor diagnostice de laborator

Inainte de a prezenta diagnosticul de laborator al virozelor respiratorii vom face o succintă trecere în revistă a agenţilor etiologici mai frecvent implicaţi.

1. Virusurile gripale, agenţii cauzali ai gripei, fac parte din familia Orthomyxoviridae, genul Influenzavirus şi au următoarele caractere:

- virioni sferici (uneori filamentoşi), cu un diametru de 90-120 nm;
- posedă un înveliş bilipidic în care sînt implantate 2 tipuri de peplomere (spiculi de glicoproteină virală) cu proprietăţi antigenice: hemaglutinina (H) şi neuraminidaza (N);
- miezul particulei virale este alcătuit din nucleocapsidă cu simetrie helicală, înconjurată de o membrană matrice proteică (M);
- genomul conţine un ARN monospiral divizat în 8 fragmente, ceea ce permite recombinările în cadrul speciei;
- virionii posedă activitate hemaglutinantă (pentru hematii de om grup 0, cocoş, cobai). Ei multiplică în cavitatea amniotică (şi după adaptare şi în cavitatea alantoidă) a oului de găină embrionat, precum şi în culturi de celule renale de maimuţă dînd hemadsorbţie;
- se cunosc 3 tipuri serologice de virus gripal stabilite pe baza specificităţii ribonucleoproteinei: tipul A, cauza principală a epidemiilor şi pandemiilor de gripă, tipul B asociat cu izbucniri epidemice mai rare şi tipul C care determină infecţii sporadice cu manifestări respiratorii reduse. Spre deosebire de virusurile B şi C, virusul gripal A poate infecta natural şi alte gazde decît omul: porci, cai, păsări, fără a depăşi însă bariera de specie.

Virusul gripal A suferă în timp o importantă variaţie antigenică care duce la apariţia de subtipuri şi variante. Acest fenomen îşi are originea în modificările antigenice ale hemaglutininei şi neuraminidazei, modificări care pot fi de 2 feluri: majore [x] (shift), ce au loc la interval de 30-40 ani, asociindu-se cu pandemii şi minore (drift), produse continuu sub presiunea imunologică a populaţiei, care stau la baza apariţiei de tulpini ce determină epidemiile sezoniere anuale. Din anul 1930 pînă în anul 1986 au fost semnalate 3 variaţii antigenice majore pentru hemaglutinină (H1,H2 şi H3) şi 2 variaţii pentru neuraminidază (N1,N2), ceea ce a dus la apariţia succesivă în timp a următoarelor subtipuri:

---

[x] Modificările antigenice majore s-ar datora fie mutaţiei genetice, fie recombinărilor genetice între tulpini umane şi animale

A/H1N1, A/H2N2 şi A/H3N2, fiecare subtip nou apărut înlocuindu-l pe cel precedent (de ex. A/H3N2 l-a înlocuit în 1968 pe A/H2N2 care circula din 1957). Din anul 1977 a reapărut subtipul A/H1N1 care circulă de atunci pe glob împreună cu subtipul A/H3N2, de obicei în perioade şi zone geografice diferite.

2. Virusurile paragripale aparţin genului *Paramyxovirus*, familia *Paramyxoviridae* şi au următoarele caractere:

- virionii, de obicei sferici, cu diametrul de ~150 nm, posedă un înveliş bilipidic în care sînt implantate 2 peplomere: hemaglutinina şi neuraminidaza;
- genomul este format din ARN monospiral; nucleocapsida are simetrie helicală;
- virionii multiplică în culturi de celule renale de maimuţă şi produc hemadsorbţie. Aglutinează hematiile umane grup O;
- se cunosc 4 serotipuri (tipul 4 cu două subtipuri: 4a şi 4b).

3. Virusul respirator sinciţial (VRS) este încadrat în familia *Paramyxoviridae*, genul *Pneumovirus*. Are caractere asemănătoare paramyxovirusurilor de care se deosebeşte prin absenţa hemaglutininei şi neuraminidazei. Cultivă în culturi de celule de linie HeLa producînd constant sinciţii.

4. Rhinovirusurile, agenţii guturaiului sau răcelii banale, aparţin genului *Rhinovirus*, familia *Picornaviridae*. Prezintă următoarele caractere:

- virioni neînveliţi, de dimensiuni mici (20-30 nm ø);
- capsida are simetrie icosaedrică (60 capsomere);
- genomul conţine ARN monospiral;
- cultivă în culturi de celule renale de maimuţă (tulpini „M") sau în celule de embrion uman (tulpini „H") incubate la 33°C (în loc de 37°C);
- există numeroase tipuri serologice, peste 120 (fiecare inducînd numai imunitate omologă), ceea ce explică posibilitatea repetării infecţiei cu un alt subtip în cursul aceluiaşi an.

5. Adenovirusurile fac parte din familia *Adenoviridae* şi au următoarele caractere:

- virioni neînveliţi, cu diametrul de 70-80 nm;
- capsida, cu simetrie icosaedrică, are 252 capsomere din

care 12 (cele situate la colţuri) au proiecţii filamentoase - fibre;

- genomul este alcătuit din ADN bicatenar;

- cultivă în celule de linie HeLa, celule diploide umane etc.;

- posedă proprietăţi hemaglutinante faţă de eritrocitele de şobolan, maimuţă şi om;

- se cunosc 37 serotipuri, din care tipurile 12,18,31 şi 7 sînt oncogene pentru hamsterul sugar (inoculat experimental);

- cauzează numeroase sindroame clinice: respiratorii (boală acută respiratorie, febră faringo-conjunctivală, pneumonie), oculare (conjunctivită, cheratoconjunctivită epidemică), adenită mezenterică, encefalită subacută, cistită acută hemoragică etc.

6. Coronavirusurile (genul Coronavirus, familia Coronaviridae) prezintă următoarele caractere:

- virioni sferici, cu diametrul de 100 nm;

- posedă un înveliş cu peplomere în formă de petale (de unde numele de corona);

- capsida cu simetrie helicală;

- genomul conţine ARN monospiral;

- se cunosc 3 serotipuri umane care cultivă în culturi de organe (ex. trahee de embrion uman).

Diagnosticul de laborator în virozele respiratorii se practică prin metode virologice şi serologice.

1. Diagnostic virologic

Diagnosticul virologic urmăreşte evidenţierea, izolarea şi identificarea virusurilor din produse patologice. In funcţie de localizarea infecţiei se vor recolta: secreţii nasale, exsudat nasofaringian şi faringian (cel mai frecvent), spută.

a. Metode rapide de diagnostic. Acestea permit evidenţierea rapidă a virusului infectant direct în produsul patologic:

i. examenul imunofluorescent şi examenul imunoenzimatic pot depista în celulele descuamate din epiteliul mucoasei respiratorii virusurile: gripal, respirator sinciţial, paragripale etc.;

ii. microscopia electronică. Virionii cu morfologie particulară (ex. coronavirusuri, adenovirusuri) pot fi uşor identificaţi. Pentru diferenţierea virusurilor respiratorii din familia Orthomyxoviridae (virusurile gripale A,B,C) şi Paramyxoviridae (virusurile paragripale, VRS), identificarea rhinovirusurilor în secreţii nasale

la bolnavi de guturai, etc. se poate recurge la imunoelectronomicroscopie: folosirea unui ser imun specific determină agregarea virionilor din produs iar după fixare şi „colorare negativă" aceştia pot fi identificaţi la microscopul electronic.

b. Izolarea virusurilor se realizează prin inocularea produselor patologice la gazde de laborator:

i. culturi de celule, în special celule renale de maimuţă, culturi de celule diploide umane (WI-38) şi uneori linii de celule (HeLa, KB). Multiplicarea virusurilor respiratorii în culturi de celule se traduce prin:

- apariţia unor modificări morfologice specifice: formarea de sinciţii (celule gigante multinucleate) în cazul virusului respirator sinciţial, apariţia de incluzii virale intranucleare bazofile în cazul adenovirusurilor şi incluzii citoplasmatice acidofile în cazul virusurilor gripale şi paragripale;

- reacţii de hemaglutinare pozitive cu lichidul culturii de celule infectată (ex. virusurile gripale, adenovirusuri) sau reacţie de hemadsorbţie (virusurile paragripale);

ii. culturi de organe: trahee de embrion uman, cornete nasale. Multiplicarea unor virusuri (coronavirusuri şi rhinovirusuri) se traduce prin imobilizarea cililor epiteliului respirator urmată de necroza celulelor superficiale;

iii. ouă de găină embrionate. Această gazdă este utilizată pentru izolarea virusurilor gripale şi paragripale folosind inocularea pe cale intraamniotică. Multiplicarea virusului va fi decelată printr-o reacţie de hemaglutinare,pozitivă cu lichidul amniotic infectat şi hematii de om grup O sau de cobai.

c. Identificarea virusurilor izolate se realizează cu ajutorul reacţiilor serologice: RFC, RIH, RN, utilizîndu-se seruri imune de referinţă.

RFC identifică, în funcţie de specificitatea antigenului fixator de complement, grupul antigenic de virus (adenovirus, virus respirator sinciţial) sau tipul antigenic (virusuri gripale: A,B, virusuri paragripale).

RIH identifică virusurile hemaglutinante stabilind tipul antigenic (virusurile paragripale), varianta antigenică sau chiar tulpina de virus (virusurile gripale).

Scanned with OKEN Scanner

RN este utilizată pentru identificarea virusurilor care prezintă numeroase tipuri antigenice (de ex. rhinovirusurile).

2. Diagnostic serologic

RFC este metoda în special folosită, utilizînd o „baterie de antigene" care include antigenele fixatoare de complement ale virusurilor implicate în mod curent ca agenţi etiologici ai sindromului respirator investigat. Laboratoarele din R.S.R. dispun în prezent de următoarele antigene virale fixatoare de complement: gripal A,B, paragripal tip 3, virus respirator sinciţial, adenovirus.

Serodiagnosticul se practică de obicei pe 2 probe de ser recoltaţe la interval de 10-14 zile pentru evidenţierea unei dinamici a anticorpilor faţă de antigenele introduse în reacţie. RFC poate fi semnificativă pentru diagnostic şi pe o singură probă de ser tratată cu 2-mercaptoetanol (2-ME): reducerea sau anularea titrului anticorpilor în proba de ser tratată cu 2-ME, comparativ cu proba martor, dovedeşte că anticorpii sînt de tip IgM, deci este vorba de o infecţie recentă sau actuală.

Stabilirea cu ajutorul RFC şi a unei „baterii de antigene" a diagnosticului etiologic într-o viroză respiratorie acută este ilustrată în fig.79. Din datele prezentate reiese diagnosticul de gripă cu virus A.

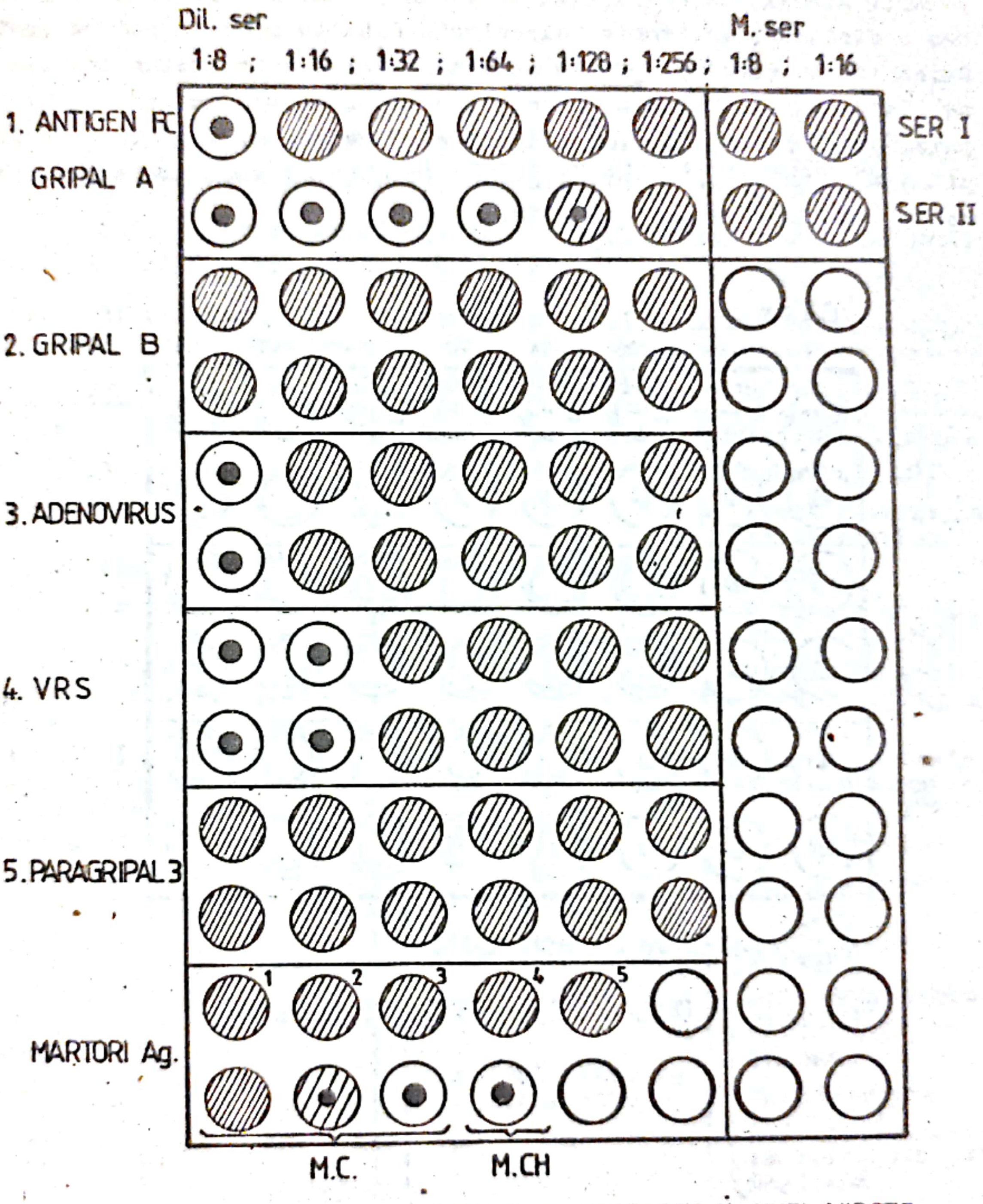


Fig.79 RFC IN DIAGNOSTICUL SEROLOGIC AL UNEI VIROZE RESPIRATORII ACUTE

Scanned with OKEN Scanner

RIH poate fi de asemeni utilizată în serodiagnostic. Ea permite stabilirea subtipului de virus gripal A (H1N1, H2N2, H3N2) sau a variantei antigenice circulante (studiu necesar pentru includerea lor în vaccin), precum şi evidenţierea amprentelor imunologice lăsate în populaţie de infecţiile respiratorii anterioare (gripale, paragripale) (fig.80). Din fig.80 reiese diagnosticul de gripă cu subtipul H1N1 de virus A şi existenţa de amprente serologice pentru subtipurile H2N2 şi H3N2.

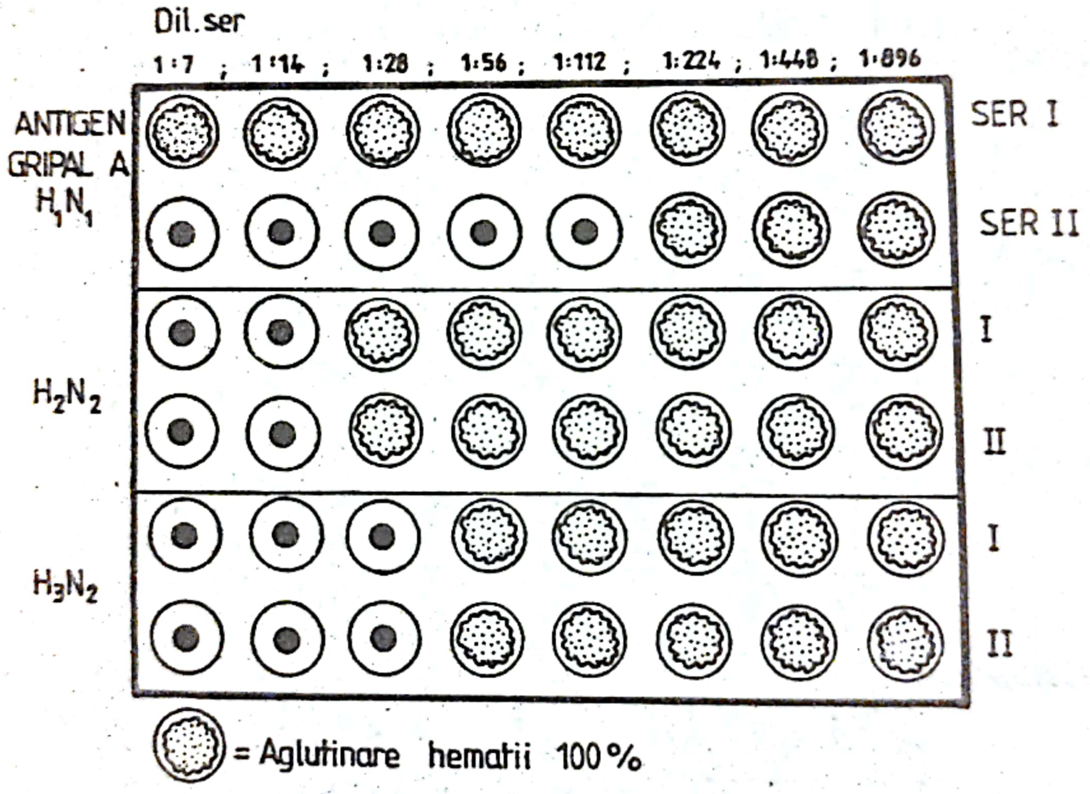


Fig.80 RIH IN DIAGNOSTICUL SEROLOGIC AL GRIPEI

XXV. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VIROZELOR ERUPTIVE

Agenţii virali implicaţi în etiologia bolilor cu manifestări eruptive sînt prezentaţi în tabelul XXV.

Tabelul XXV. Agenţi virali care produc boli cu manifestări eruptive

Virus	Caracterul erupţiei	Boli cauzate
Rujeolic	Maculo-papulară	Rujeola
Rubeolic	"	Rubeola
Echovirus x)	"	Febră enterovirală cu exantem
Herpes simplex 1,2	Veziculară	Herpes
Varicella-zoster	"	Varicela şi zoster
Coxsackie A x) (serotipuri: 1-6, 8,10,22), rar B	"	Faringită veziculară (herpangină)
Coxsackie A (serotipuri: 16, mai rar 4,5,9 şi 10)	"	Stomatită veziculară cu exantem
Enterovirus 71 x)	"	"
Aphtovirus	"	Febră aftoasă
Poxvirusuri	Pustulară	Variolă Vaccină
	Leziuni cutanate localizate	Molluscum contagiosum Cowpox Pseudocowpox Orf sau dermatita pustulară contagioasă

x) Virusuri care vor fi discutate în cap.XXVI

Scanned with OKEN Scanner

Inainte de a expune metodologia diagnosticului de laborator în virozele eruptive vom prezenta succint caracteristicile mai importante ale agenților etiologici incriminați.

1. Virusul rujeolic face parte din genul Morbillivirus, familia Paramyxoviridae. Este un virus ARN, cu simetrie helicală, a cărui înveliș posedă numai hemaglutinină. Aglutinează hematiile de maimuță. Multiplică în celule diploide umane cu formare de sinciții.

Cauzează rujeola, boală comună a copilăriei, foarte contagioasă, caracterizată prin febră, petele Koplik [x)] și un exantem maculo-papular. Uneori poate evolua cu complicații: respiratorii (bronșită, pneumonie, bronhopneumonie etc.) sau nervoase (encefalită, encefalomielită post-infecțioasă, panencefalită sclerozantă subacută, boală degenerativă cronică a SNC).

2. Virusul rubeolic aparține genului Rubivirus, familia Togaviridae. Are următoarele caractere:

- virion sferic, cu un diametru de 60 nm, capsidă cu simetrie helicală și genom ARN;
- posedă un înveliș cu proiecții de hemaglutinină care au proprietatea de a aglutina eritrocitele de pui de găină de o zi, gîscă, porumbel și cele de om grup O;
- multiplică în diferite tipuri de culturi de celule cu sau fără efect citopatic;
- cauzează rubeola, boală febrilă cu raș macular și limfadenopatie, care afectează copilul și adultul tînăr. De obicei benignă poate da uneori complicații: artrite (mai ales la femei), meningite, encefalite, rar panencefalita progresivă (boală degenerativă a SNC);
- virusul are potențial teratogen cînd rubeola este contractată de femeia gravidă, în special în primul trimestru de sarcină.

3. Virusul Herpes simplex (VHS), tipurile 1 și 2 și virusul Varicella-zoster (VVZ) sînt încadrate în familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae [xx)].

---

x) Macule roșii cu centrul alb-albăstrui, situate pe mucoasa obrazului în dreptul ultimilor molari

xx) Alături de VHS și VVZ, din familia Herpesviridae mai fac parte 2 virusuri implicate în infecții la om: virusul citomegalic, agentul cauzal al bolii cu incluzii citomegalice și virusul Epstein-Barr asociat cu febra glandulară (mononucleoza infecțioasă) și unele tumori maligne: limfomul Burkitt la copii în Africa și carcinomul naso-faringian la adult în Asia de sud-est

Herpesvirusurile au următoarele proprietăţi:

- virionul, cu diametrul de 140-200 nm, posedă o capsidă icosaedrică cu 162 capsomere şi un peplos lipidic;

- miezul particulei virale conţine un ADN bicatenar înfăşurat pe un mosor proteic;

- multiplică în culturi de celule, unde determină un efect citopatic şi formarea de incluzii intranucleare caracteristice, şi pe membrana chorioalantoidă a oului de găină embrionat unde produce poxuri (pustule) mici, albe;

- determină frecvent infecţii cronice, persistente.

VHS cauzează infecţii primare şi recurenţiale: cutanate (eczemă herpetică, dermatită herpetică, herpes traumatic), ale mucoaselor (gingivostomatită, herpes labial, genital), oculare (cheratită, cheratoconjunctivită), ale SNC (encefalite, meningoencefalite), generalizate (herpesul neonatal) x).

VVZ determină ca infecţie primară varicela, febră eruptivă a copilăriei cu exantem vezicular ce apare în valuri succesive, iar ca infecţie recurenţială zosterul întîlnit sporadic la adulţi şi vîrstnici care au avut varicelă în antecedente. Acesta se manifestă prin erupţie veziculară cutanată distribuită mai frecvent de-a lungul nervilor intercostali sau a trigemenului; leziunile sînt unilaterale şi foarte dureroase.

4. Poxvirusurile fac parte din familia Poxviridae, genurile Orthopoxvirus şi Parapoxvirus.

Virionul de dimensiuni mari, 300 x 250 nm, în formă de cărămidă, are o structură complexă: un înveliş care conţine lipide şi structuri proteice tubulare, precum şi 1 sau 2 corpi laterali şi un miez ce include genomul - o moleculă de ADN bicatenar. Posedă o hemaglutinină separată de virioni.

In genul Orthopoxvirus se încadrează virusurile: variolic (agentul cauzal al variolei umane, boală cu exantem pustular, în prezent eradicată), vaccinia (folosit în trecut la vaccinarea antivariolică cu care ocazie puteau apare unele complicaţii post-vaccinale, inclusiv eruptive), cowpox (agentul cauzal al variolei vacilor, boală ce poate fi transmisă la mulgători, manifestîndu-se prin leziuni cutanate pe mîini) şi monkeypox (agentul etiologic al variolei maimuţelor, transmisibilă omului prin contactul cu animalele

---

x) Mai recent VHS de tip 2 a fost asociat cu carcinomul de col uterin

bolnave; îmbolnăvirile umane sînt asemănătoare variolei).

Din genul Parapoxvirus amintim virusurile: Molluscum contagiosum (agentul cauzal al unor mici tumorete benigne pe tegument, transmise prin contact interuman), Orf (agentul cauzal al dermatitei pustulare contagioase, boală a oilor şi caprelor transmisibilă omului la care se manifestă ca o leziune unică papulară ce devine veziculară la mînă, braţ, uneori la faţă) şi Pseudocowpox (care determină leziuni pe uger la bovine, transmisibilă la om, în special mulgători: pe dosul mîinii apar papule roşii, nedureroase - „nodulii lăptarului").

5. Aphtovirusurile sînt încadrate în familia Picornaviridae (vezi cap.XXIV), genul Aphtovirus. Cauzează febra aftoasă, boală a bovideelor care poate fi uneori transmisă la om prin contact cu animalele bolnave sau prin consumul de lapte infectat nefiert. Boala se caracterizează prin febră, salivaţie şi prezenţa de vezicule în cavitatea bucală.

Există cel puţin 7 serotipuri cu peste 50 subtipuri.

Aphtovirusurile sînt patogene pentru şoarecele sugar, animal pe care pot fi izolate, şi de asemeni se dezvoltă bine în culturi celulare de rinichi de hamster, linia BHK-21.

In ceea ce priveşte diagnosticul virozelor eruptive trebuie precizat faptul că el este uşor de stabilit pe criterii clinice atunci cînd acestea evoluează epidemic. Diagnosticul de laborator se impune însă în anumite situaţii: de ex. în infecţia rubeolică la gravide (datorită efectelor teratogene ale virusului), herpesul neonatal, rujeola fără semnul Koplik (posibilitate de confuzie cu rubeola) etc. In aceste cazuri se recurge la diagnosticul virologic şi/sau serologic.

1. Diagnostic virologic

In raport cu agentul viral incriminat în producerea virozei se va recolta sînge, exsudat faringian, materii fecale (în infecţiile cu virusuri coxsackie, echovirusuri, enterovirus 71) şi în special produse din leziuni cutanate:

- în stadiul de erupţie maculo-papulară se recoltează serozitatea obţinută prin raclare cu o lanţetă fină, fără a produce sîngerare;

- în stadiul vezicular se aspiră lichidul din vezicule prin puncţionare cu o pipetă Pasteur fin efilată. Baza veziculelor deschise va fi raclată cu o ansă sterilă, produsul obţinut servind la efectuarea de frotiuri pentru examenul microscopic;

- în faza de pustule se prelevă conţinutul acestora cu o pipetă Pasteur;

- crustele se detaşează cu ajutorul unei pense şi foarfece ocular şi se introduc în eprubete sterile.

a. Examenul direct al produselor patologice poate fi efectuat prin următoarele metode:

i. examenul microscopic al frotiurilor după coloraţii speciale (Giemsa, Nicolau) evidenţiază pentru virusurile mari din familia Poxviridae corpusculii elementari. De asemeni se pot observa celule gigante multinucleate cu incluzii citoplasmatice (corpii lui Gaurnieri în infecţiile cu poxvirusuri) sau nucleare (incluzii de tip Cowdry în herpes);

ii. examenul electronooptic permite stabilirea unui diagnostic rapid, pe baza aspectului caracteristic al virionului (ex. virusurile variolic, herpetic);

iii. examenul imunofluorescent deceleează antigenele virale în celulele infectate (ex. infecţia herpetică, varicela, rujeola);

iv. tehnica imunoenzimatică (ELISA) permite diagnosticul rapid al infecţiei cu virusul Herpes simplex 1 şi 2 în herpesul genital pe celule escoriate de pe colul uterin.

b. Izolarea virusului se realizează prin inocularea produselor patologice pe diferite gazde de laborator:

i. ouă de găină embrionate. Inocularea pe membrana chorioalantoidă (MCA) permite, după o incubare de 3-4 zile, izolarea unor virusuri eruptive: poxvirusuri şi VHS. Astfel virusul variolic produce leziuni pustuloase (poxuri), mici, de 1-2 mm Ø, bombate, albe, netede, virusul cowpox induce formarea unor leziuni mari, de 4-5 mm Ø, cu centrul necrotic şi hemoragii întinse în timp ce VHS cauzează leziuni mici asemănătoare virusului variolic dar cu necroză centrală.

Examenul histologic al leziunilor de pe MCA evidenţiază în celulele infectate prezenţa de incluzii citoplasmatice (poxvirusuri) sau nucleare (virusuri herpetice);

ii. culturi de celule. Culturile de celule primare (rinichi de maimuţă, amnios uman etc.), culturile de celule diploide umane (WI-38), precum şi liniile permanente de celule (ex. HeLa, KB, BHK-21) permit izolarea majorităţii virusurilor implicate în sin-

droame eruptive:

- VHS determină un efect citopatic tradus prin apariția de focare de celule rotunjite și balonizate grupate în „ciorchine de struguri" și uneori prin formarea de sinciții;

- VVZ determină un efect citopatic caracterizat prin rotunjirea celulelor în focare;

- virusul rujeolic produce un efect citopatic tradus prin formarea de sinciții;

- virusul rubeolic multiplică cu efect citopatic vizibil numai cînd este inoculat în anumite linii celulare: RK13 (rinichi de iepure), SIRC (cornee de iepure) și VERO (celule renale de maimuță);

iii. animale de laborator. Aphtevirusurile inoculate în planta șoarecilor sugari produc paralizii de tip flasc.

c. Identificarea virusului. Virusurile izolate vor fi identificate cu ajutorul unor reacții serologice: RFC, RIH, RN, ELISA etc., în prezența serurilor imune cunoscute.

2. Diagnostic serologic

Serodiagnosticul se bazează pe cercetarea dinamicii anticorpilor în două sau mai multe probe de ser recoltate de la bolnav la 10-14 zile interval. Reacțiile cele mai folosite sînt RFC și RIH.

RFC prezintă, cel mai adesea, avantajul unei specificități de grup, evidențiind anticorpii care persistă în organism cîteva luni (IgM), ceea ce permite afirmarea unei infecții recente sau actuale (rujeolă, rubeolă, herpes).

RIH este utilizată cel mai frecvent, în diagnosticul infecției rubeolice la gravide. Probele de ser sînt tratate în prealabil pentru îndepărtarea inhibitorilor nespecifici (adsorbție cu caolin, tratare cu heparină - $MgCl_2$ sau dextran sulfat - $CaCl_2$). In reacție se utilizează un antigen rubeolic hemaglutinant față de hematii de pui de o zi, porumbel sau hematii de om grup O tratate cu tripsină la +4°C. Pentru evidențierea anticorpilor IgM (infecție actuală) este indicată folosirea serurilor tratate cu 2-mercaptoetanol (2-ME) (fig.81).

Mai recent în serodiagnosticul rubeolei este folosit testul imunoenzimatic (ELISA) pentru IgM specifice.

Scanned with OKEN Scanner

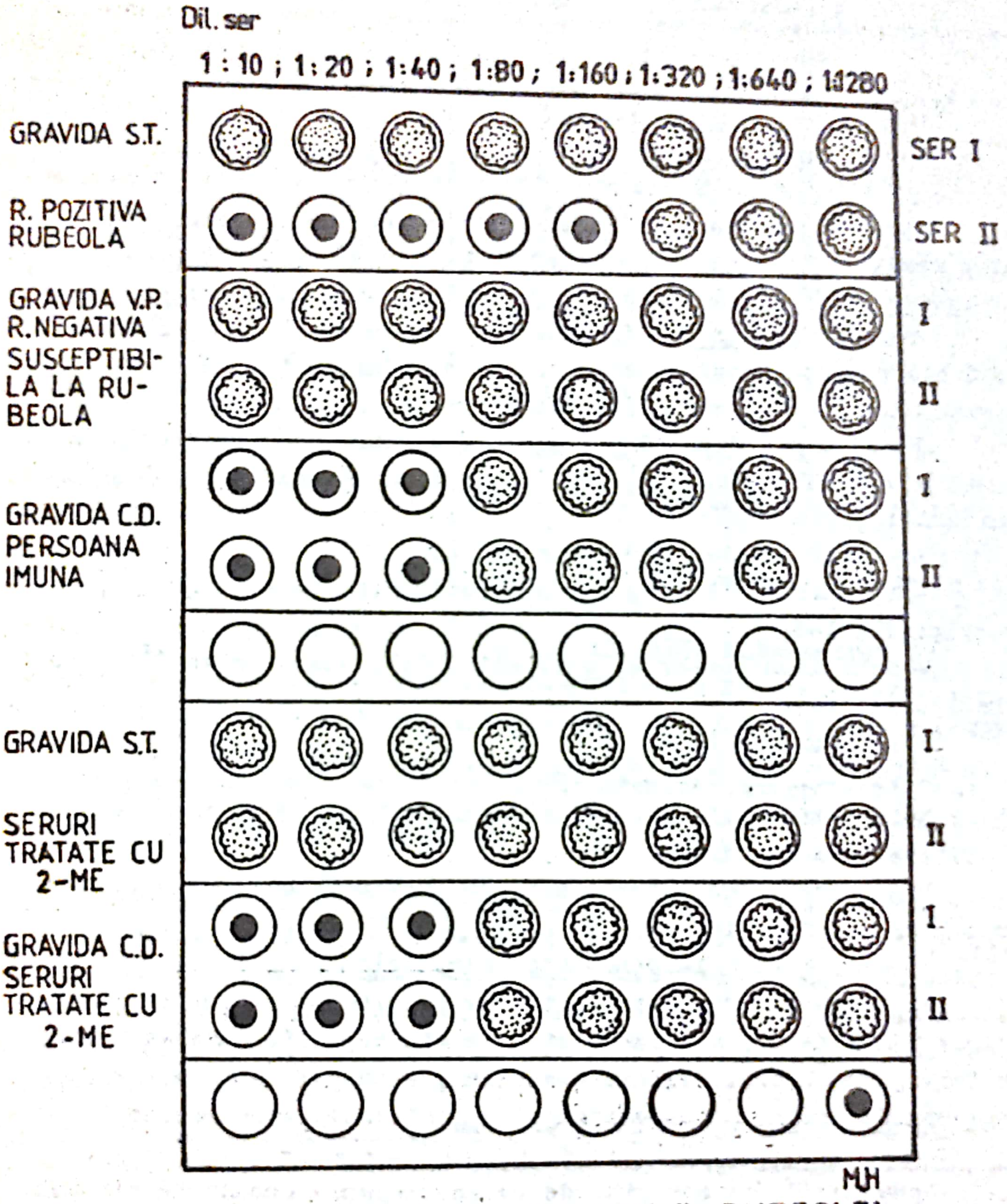


FIG. 81 RIH IN SERODIAGNOSTICUL RUBEOLEI LA GRAVIDE

Scanned with OKEN Scanner

XXVI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ENTEROVIROZELOR

Enterovirozele sînt în special cauzate de virusuri aparținînd familiei Reoviridae cu genurile Reovirus (respirator enteric) și Rotavirus [x)] și familiei Picornaviridae cu genul Enterovirus.

Familia Reoviridae include virioni de 68-80 nm Ø, neînveliți, cu dublă capsidă icosaedrică; genomul conține un ARN dublu spiral format din 10-12 segmente (la rotavirusuri, 11).

Familia Picornaviridae cuprinde virusuri cu morfologia descrisă în cap.XXIV. Genul Enterovirus are 72 membri, grupați după cum urmează:

- poliovirus, cu serotipurile 1-3;
- coxsackie [xx)] grup A, cu serotipurile 1-24 și grup B, cu serotipurile 1-6;
- echovirus (enteric, citopatic, (h), uman, orfan [xxx)]) cu serotipurile 1-34;
- enterovirus 68-71;
- virusul hepatitei A (enterovirus 72).

Enterovirusurile și reovirusurile determină variate sindroame clinice (tabelul XXVI).

Diagnosticul de laborator în enteroviroze este virologic dar mai ales serologic.

1. Diagnostic virologic

In toate sindroamele clinice se recoltează ca produs patologic materiile fecale și, în funcție de sindromul investigat, exsudat faringian, l.c.r., lichid vezicular, secreție conjunctivală, fragmente de creier și mușchi cardiac prelevate la necropsie.

---

x) Denumire de la aspectul de roată pe care-l prezintă virusul la microscopul electronic (în lat. rota = roată)

xx) Denumire de la orașul Coxsackie din SUA unde virusul a fost izolat prima dată

xxx) Inițial nu au fost bine individualizate sindroamele clinice cauzate

Tabelul XXVI. Principalele sindroame clinice cauzate de enterovirusuri[x)] şi reovirusuri

Sindrom	Agent cauzal
Poliomielită	Poliovirus
Boală febrilă	Coxsackie A şi B; Echovirus
Meningită aseptică	Poliovirus; Coxsackie A şi B; Echovirus
Faringită veziculară (herpangina)	Coxsackie A, rar B
Stomatită veziculară cu exantem	Coxsackie A; Echovirus 71
Mialgia epidemică (pleurodinia sau boala din Bornholm)	Coxsackie B
Miocardita şi pericardita	Coxsackie B
Boala respiratorie („gripa de vară")	Reovirus; Coxsackie B; Echovirus
Gastroenterită	Rotavirus[xx)]; Agentul Norwalk[xx)]; Reovirus; Poliovirus; Coxsackie A; Echovirus
Conjunctivită hemoragică acută	Coxsackie A24; Enterovirus 70

x) Hepatita cu virus A (enterovirus 72) face obiectul cap.XXVIII

xx) Rotavirusul este principalul agent cauzal al gastroenteritei infantile (afectează sugarul şi copilul mic) alături de agentul Norwalk, un virus mic (cca 20 nm Ø), cu simetrie icosaedrică şi genom alcătuit din ADN monospiral

a. Metode rapide de diagnostic. In unele boli, de ex. gastroenteritele infantile, este posibilă evidenţierea rapidă a agentului viral direct în materiile fecale prin diferite metode: microscopie electronică, imunoelectronomicroscopie, tehnici imunoenzimatice şi mai recent aglutinarea particulelor de latex învelite cu anticorpi (test efectuat pe lamă).

b. Izolarea virusurilor este posibilă prin inocularea produselor patologice la diferite gazde de laborator:

- culturi de celule renale de maimuţă (poliovirus, echovirus coxsackie B), amnios uman, culturi de celule diploide (WI-38); se urmăreşte apariţia efectului citopatic tradus prin rotunjirea şi desprinderea celulelor de pe sticlă;

- culturi de organ (de ex. intestin de embrion uman pentru izolarea rotavirusurilor);

- șoricei nou-născuți (24-48 ore) care, inoculați intraperitoneal, permit izolarea virusurilor coxsackie: virusurile de grup A determină paralizii de tip flasc iar cele de grup B paralizii spastice și tremurături.

c. Identificarea virusurilor izolate se realizează cel mai frecvent cu ajutorul reacției de neutralizare în culturi de celule folosind seruri imune de referință. Numărul mare de serotipuri al enterovirusurilor (coxsackie, poliovirus, echovirus) face însă dificilă identificarea acestora de aceea pentru diagnosticul infecțiilor enterice este suficientă izolarea agentului viral și efectuarea reacției de neutralizare cu eșantioanele de ser recoltate în cursul infecției de la bolnav.

2. Diagnostic serologic

Serodiagnosticul se practică pe 2 probe de ser (precoce și tardiv) prelevate de la bolnav, folosind reacția de neutralizare sau reacția de fixare a complementului. Deoarece prezența unui enterovirus în materii fecale nu îl implică etiologic, este necesară evidențierea în probele de ser a creșterii titrului anticorpilor specifici față de virusul izolat. Apartenența anticorpilor la clasa IgM dovedește existența unei infecții actuale, deci un răspuns imun primar.

XXVII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL NEUROVIROZELOR

Numeroase virusuri se pot multiplica în SNC unde ajung consecutiv difuzării, de la poarta de intrare, pe cale sangvină (ex. enterovirusurile, arbovirusurile) sau neuronală (ex. virusul rabiei). Prezența lor în SNC poate fi urmată de apariția unei boli neurologice sau poate fi asimptomatică. Redăm mai jos sindroamele neurologice cauzate de unele virusuri cu tropism pentru SNC.

Tabelul XXVII. Virusuri care produc infecții la nivelul SNC

Virusuri	Sindroame
Poliovirus 1-3 Urlian Coxsackie A7,9; B5 ECHO (4,6,30) Herpes simplex V.coriomeningitei limfocitare	Meningită „aseptică" [x]
Arbovirusuri [xx] Urlian Herpes simplex Coxsackie B Rabie Enterovirus 71	Encefalită
Poliovirus 1-3 Coxsackie A	Boală paralitică
Gripal Rujeolic Urlian Rubeolic Varicella-zoster	Encefalomielită postinfecțioasă

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XXVII (continuare)

	Boli degenerative ale SNC xxx):
Rujeolic	- panencefalită sclerozantă subacută (PESS);
Rubeolic	- panencefalită progresivă (PEP);
Herpes simplex	- opticoneuvrită subacută;
Papovavirus JC	- leucoencefalopatie multifocală progresivă
V.Kuru xxxx)	Boala Kuru
V.Creutzfeldt-Jacob	Boala Creutzfeldt-Jacob

x) Meningită cu l.c.r. clar. Se caracterizează prin prezența unui număr crescut de elemente celulare (100 pînă la cîteva mii/ mmc, cu predominanță limfocitară; gluco- și clorurorahia au valori normale sau scăzute. Proteinorahia este ușor crescută.

xx) Arbovirus = termen prescurtat de la „arthropod borne virus" (virus transmis de artropode)

xxx) Bolile degenerative ale SNC sînt boli virale lente, rezultat al infecției persistente a SNC cu virusuri convenționale (virus rujeolic, rubeolic, papovavirus) sau cu prioni

xxxx) Virusurile Kuru și Creutzfeldt-Jacob fac parte dintr-un grup de agenți infecțioși denumiți prioni. Ei sînt constituiți din filamente de proteină în care nu s-a evidențiat prezența acidului nucleic. Prionii sînt agenții cauzali ai unor boli grave ale SNC cu sfîrșit letal: encefalopatii spongiforme subacute

Pentru înțelegerea metodologiei diagnosticului de laborator în neuroviroze vom prezenta succint caracteristicile unor agenți virali implicați în aceste infecții care nu au fost descriși în capitolele anterioare.

1. Arbovirusurile sînt virusuri transmise omului prin înțepătura artropodelor hematofage (țînțari, căpușe, flebotomi). Infecțiile cauzate pot fi asimptomatice sau se prezintă sub forma unor sindroame clinice variate: meningo-encefalite, encefalite, febre hemoragice etc. care, în aproximativ 30-50% din cazuri, lasă sechele mentale și motorii severe, în special la copii. Cu mici excepții, arbovirozele nu se găsesc în zona noastră geografică.

Arbovirusurile sînt virusuri ARN care aparțin la familii

foarte diferite [x].

2. Virusul rabic face parte din familia Rhabdoviridae, genul Lyssavirus. Este un virus ARN în formă de glonț, 180/70 nm, învelit, cu simetrie helicală. Cauzează rabia (turbarea), o encefalită acută, totdeauna letală, transmisă omului prin mușcătura sau zgârietura animalelor infectate (de obicei câine, pisică, lup, vulpe etc.; mai rar vampiri și lilieci). Virusul rabic ajunge în SNC pe cale neuronală, difuzînd centripet în lungul nervilor periferici.

3. Virusul choriomeningitei limfocitare (CML) se încadrează în familia Arenaviridae, genul Arenavirus, care include virusuri ARN, învelite, cu dimensiuni de 100-300 nm; arenavirusurile au în structură ribosomi celulari care conferă virionului aspect nisipos (arena).

4. Virusul urlian face parte din familia Paramyxoviridae (alături de virusurile paragripale, virusul rujeolic și virusul respirator sincițial), genul Paramyxovirus. Este un virus ARN, cu simetrie helicală, învelit. Multiplică în cavitatea amniotică a embrionului de găină și în diferite sisteme celulare (ex. culturi celulare de rinichi de maimuță).

Virusul urlian este agentul cauzal al parotiditei epidemice (oreion), boală febrilă a copilăriei (5-15 ani) caracterizată prin inflamația nesupurativă a glandelor salivare (parotidă și glandele submaxilare, sublinguale). In cadrul complicațiilor posibile se înscriu și complicațiile neurologice (meningite aseptice, meningoencefalite, rar paralizii.

5. Agenții cauzali ai bolilor degenerative cronice ale SNC aparțin familiei Togaviridae, genul Rubivirus (vezi cap.XXV), familiei Paramyxoviridae, genul Morbillivirus (vezi cap.XXV), familiei Herpesviridae (vezi cap.XXV), familiei Papovaviridae și prionilor.

Papovavirus JC, agentul cauzal al leucoencefalopatiei progresive multifocale face parte din genul Polyomavirus, familia Papovaviridae. Este un virus ADN, cu diametrul de 52-54 nm, neînvelit, avînd o simetrie icosaedrică.

Diagnosticul de laborator în neuroviroze se practică prin

---

[x] Togaviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Filoviridae, Rhabdoviridae

metode virologice și serologice.

1. Diagnostic virologic

In infecțiile virale ale SNC se recoltează ca produse patologice l.c.r., sînge, exsudat faringian, materii fecale (în cazul enterovirusurilor), iar postmortem fragmente de creier, măduvă.

a. Metode rapide de diagnostic

i. Examenul microscopic direct al amprentelor de țesut nervos (cornul lui Ammon, zona hipocamp) permite, în rabie, evidențierea în citoplasma neuronilor a incluziilor oxifile caracteristice: corpusculii Babeș-Negri.

ii. Examenul imunofluorescent, metoda directă, efectuat pe amprente de creier, frotiu corneean sau biopsie cutanată, poate decela antigenele virusului rabic, în absența corpusculilor Babeș-Negri. De asemeni poate releva unele componente virale în țesutul nervos în cazul bolilor degenerative cauzate de virusuri convenționale.

iii. Metoda imunoenzimatică poate fi folosită pentru:

- evidențierea virusului rabic în amprente din zone de elecție din creier;
- identificarea nucleocapsidelor rujeolice în creier la bolnavi cu panencefalită sclerozantă subacută;
- localizarea papovavirusurilor în substanța cerebrală la persoane cu leucoencefalopatie multifocală progresivă;
- decelarea antigenelor arbovirale direct în produse patologice.

b. Izolarea virusului. Izolarea virusului incriminat în infecție poate fi realizată prin inocularea diferitelor gazde de laborator:

i. culturi de celule. Pot fi folosite culturi celulare de rinichi de maimuță (Poliovirus, virusuri Coxsackie, ECHO, urlian), linia de celule VERO, culturi de celule diploide (WI-38), urmărindu-se efectul citopatogen.

La bolnavii cu sindroame neurologice degenerative (PESS, PEP), virusul poate fi izolat din fragmente de SNC, recoltate prin puncție biopsică, prin cocultivarea celulelor nervoase infectate cu celule permisive [x] (ex. celule renale de maimuță);

---

[x] Celule care permit maturarea (demascarea) virusului defectiv

ii. animale de laborator. Inocularea şoarecelui nou-născut (24-48 ore), pe cale subcutanată sau intracerebrală, permite izolarea virusurilor Coxsackie A şi B: tulpinile de virus A determină paralizii de tip flasc ale membrelor iar tulpinile de virus B paralizii de tip spastic. Inocularea intracerebrală a şoarecelui sugar permite de asemeni izolarea arbovirusurilor din sînge (animalul moare cu fenomene de encefalită), precum şi a virusului rabic din substanţa cerebrală, salivă, l.c.r. (animalul prezintă paralizii, convulsii şi incluzii Babeş-Negri).

Inocularea intracerebrală a şoarecelui adult constituie o metodă de izolare a virusului CML: animalele inoculate prezintă, după o perioadă de incubaţie, contracturi tonico-clonice la excitaţii minore; ele mor adesea în criză avînd o poziţie caracteristică: membrele posterioare în extensie, coloana dorsală în flexie (cifoză) iar membrele anterioare flectate pe torace;

iii. embrioni de găină. Prin această metodă poate fi izolat virusul urlian (inoculare intraamniotică), virusul herpetic (inoculare pe membrana chorioalantoidă) şi unele arbovirusuri (inoculare intravitelină).

c. Identificarea virusului. Identificarea virusului izolat se face cu ajutorul unor reacţii serologice: RFC, RIH, RN, utilizînd seruri imune cunoscute:

i. RFC este folosită pentru identificarea arbovirusurilor, a virusului herpetic, virusului rubeolic;

ii. RIH permite identificarea virusurilor hemaglutinante (ex. arbovirusuri, virus rubeolic, rujeolic, adenovirusuri);

iii. RN este utilă pentru identificarea serotipurilor de virus (Poliovirus, virusuri Coxsackie, ECHO etc.), executîndu-se în culturi de celule.

2. Diagnostic serologic

Serodiagnosticul se bazează pe aceleaşi reacţii serologice folosite la identificarea virusului: RFC, RIH şi RN, cu deosebirea că se utilizează 2 probe de ser (acut şi convalescent) recoltate de la pacient, pentru a urmări dinamica titrului anticorpilor, şi o „baterie de antigene" care include virusurile posibil implicate în sindromul clinic cercetat.

- RFC are, în general, o specificitate de grup, fiind utilă în serodiagnosticul arbovirozelor, meningo-encefalitei herpetice, urliene, CML. In infecţiile cu enterovirusuri (Poliovirus, virusuri Coxsackie, ECHO), RFC prezintă o specificitate de serotip, corespunzătoare reacţiei de neutralizare (vezi mai jos).

Stabilirea cu ajutorul RFC şi a unei „baterii de antigene" FC a diagnosticului etiologic într-o neuroviroză este redată în fig.82. Din datele prezentate reiese diagnosticul de meningită urliană;

- RIH prezintă o specificitate de serogrup, fiind frecvent folosită în diagnosticul neurovirozelor (ex. arboviroze, PESS, PEP [x]), infecţii herpetice);

- RN poate fi practicată cu toate serotipurile virusului incriminat ca agent etiologic sau cu tulpina de virus izolată de la bolnav. Reacţia este utilizată în serodiagnosticul infecţiilor cu enterovirusuri, arbovirusuri.

---

x) In PESS, ca şi în PEP, cercetarea anticorpilor se va face şi în l.c.r.

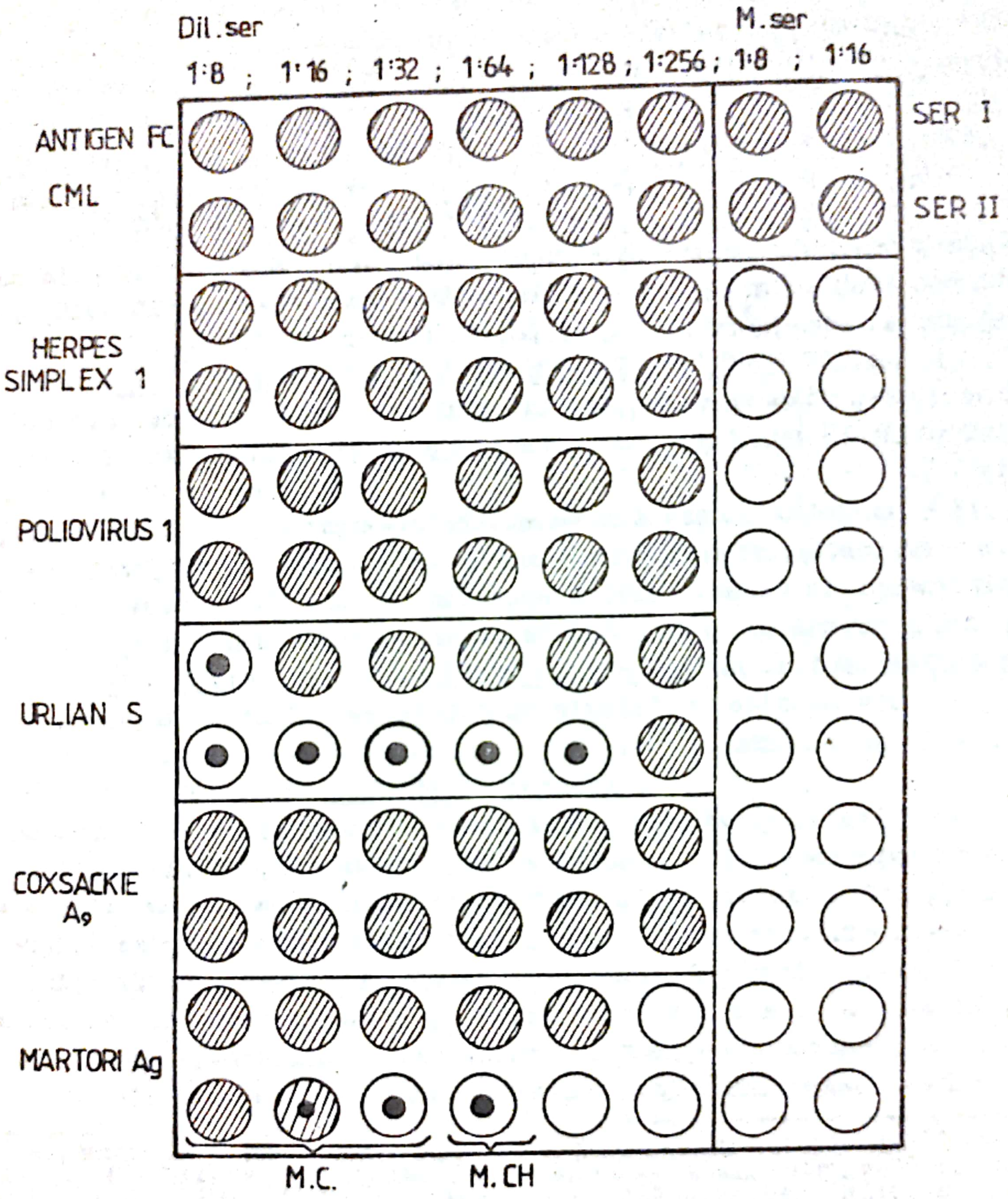


Fig.82 RFC IN DIAGNOSTICUL SEROLOGIC AL UNEI NEUROVIROZE

Scanned with OKEN Scanner

XXVIII. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITELOR VIRALE

Prin termenul de hepatită virală se înțelege inflamația acută sau cronică a ficatului cauzată de virusurile hepatitice A, B şi non-A, non-B x).

A. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITEI VIRALE A

Hepatita virală A are ca agent etiologic un virus ARN cu diametrul de 27 nm, încadrat în genul Enterovirus, familia Picornaviridae.

Hepatita virală A este o infecție aproape totdeauna acută, care nu evoluează spre cronicizare de aceea nu există purtători permanenți de virus. Survine sporadic sau sub formă de epidemii, în special toamna şi iarna, după o incubație de cca 30 zile, afectînd mai ales copiii. Este transmisă predominant pe cale fecal-orală.

Diagnosticul etiologic constă într-un diagnostic virologic şi unul serologic.

1. Diagnostic virologic

Virusul hepatitei A (VHA) poate fi evidențiat în extracte de materii fecale xx) cu ajutorul imunomicroscopiei electronice (IME), RIA în fază solidă sau tehnicii ELISA. De asemeni el poate fi izolat în culturi celulare primare de rinichi de maimuță, precum şi în unele linii celulare umane şi simiene. Deoarece infecția nu produce, în general, efect citopatic, prezența virusului va fi decelată printr-o reacție serologică: imunofluorescență, dozaj radioimun sau imunoenzimatic.

---

x) Hepatita non-A, non-B pare a fi produsă de 3 virusuri, altele decît virusurile A şi B: 2 agenți virali, transmisibili pe cale parenterală, responsabili de un mare număr de hepatite post-transfuzionale (90% în SUA), cu înalt potențial de cronicizare şi un al 3-lea virus care cauzează o hepatită epidemică, cu transmisie hidrică, fecal-orală. Diagnosticul de hepatită non-A, non-B se stabileşte deocamdată prin excluderea infecției cu virusurile A şi B

xx) VHA este prezent în scaun cu 2-3 săptămîni înaintea instalării bolii şi persistă pînă la 1-2 săptămîni după vindecare

2. Diagnostic serologic

Serodiagnosticul este metoda curentă de diagnostic în hepatita A. Evidenţierea unei dinamici a anticorpilor faţă de VHA pe 2 probe de ser (acut şi convalescent) dar mai ales stabilirea apartenenţei anticorpilor anti-VHA la clasa IgM [x)] atestă diagnosticul de infecţie recentă. Reacţiile serologice utilizate sînt: RFC, IEM, testul de imunoaderenţă-hemaglutinare (IAHA) [xx)], RIA sau ELISA.

B. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HEPATITEI VIRALE B

Hepatita virală B este cauzată de un virus ADN cu structură particulară, încă neclasificat, avînd diametrul de 42 nm (particula Dane). El conţine un miez de 28 nm, inclus într-un înveliş lipoproteic cu grosimea de 7 nm. In miez se găseşte o moleculă de ADN bicatenar (o spiră de lungime fixă şi alta mai scurtă, de lungime variabilă) şi o enzimă: ADN polimeraza - ADN dependentă necesară replicării acidului nucleic.

In serul persoanelor infectate cu virusul hepatitei B (VHB) se pot evidenţia la microscopul electronic 3 entităţi morfologice distincte:

- particule sferice, de 22 nm Ø, cu suprafaţa fin granulară;
- forme filamentoase, tubulare, cu acelaşi diametru şi o lungime variabilă, ce poate depăşi 300 nm; şi
- particule mari sferice de 42 nm Ø, particulele Dane, care reprezintă VHB complet, infecţios.

Toate cele 3 forme morfologice poartă antigen HB de suprafaţă, - AgHBs (cu mai multe subtipuri), dar numai particulele Dane au încă două antigene: antigenul HB central, - AgHBc şi antigenul e (enzimă ?), - AgHBe. Aceste antigene stimulează apariţia în organism a anticorpilor corespunzători: anti-HBs, anti-HBc şi respectiv anti-HBe.

Hepatita virală B este o importantă problemă de sănătate publică atît prin morbiditatea ridicată cît şi prin sechelele invali-

---

x) Anticorpii IgM apar precoce în cursul bolii (în faza acută) şi au o persistenţă limitată, în timp ce anticorpii IgG apar mai tardiv şi persistă foarte mulţi ani

xx) Ca principiu, complexele imune formate între VHA cunoscut şi anti-VHA din serul de cercetat sînt incubate cu o sursă de complement (C) după care se adaugă hematii de om grup O (care au pe suprafaţă receptori pentru componenta C3), rezultînd hemaglutinarea

dante: 5-20% din bolnavi fac hepatită cronică activă care evoluează spre ciroză hepatică şi carcinom primar hepatocelular (hepatom).

Boala survine după o perioadă de incubaţie lungă (în medie 60-90 zile) fiind transmisă predominant pe cale parenterală (transfuzii, hemodializă, injecţii, intervenţii stomatologice etc.). In afară de calea parenterală sînt implicate însă şi căi neparenterale (orală, sexuală, transmisie de la mamă la făt) deoarece virusul a fost găsit în diferite produse de secreţie şi excreţie ale organismului uman ca salivă, urină, fecale, secreţii vaginale, lichid seminal, lapte.

In absenţa gazdelor de laborator (virusul n-a putut fi încă izolat „in vitro"), diagnosticul etiologic al hepatitei B se bazează pe evidenţierea în serul bolnavilor a antigenelor VHB x) şi a anticorpilor corespunzători.

Tehnicile serologice folosite pentru decelarea markerilor VHB pot fi clasificate în:

i. tehnici de „primă generaţie", uşor de efectuat în toate laboratoarele dar puţin sensibile: IDD, IEP-C, RFC;

ii. tehnici de „a doua generaţie", mai sensibile dar mai greu de executat deoarece necesită reactivi puri: reacţia de hemaglutinare pasivă (pentru evidenţierea anti-HBs) şi reacţia de hemaglutinare pasivă inversă (pentru decelarea AgHBs) xx);

iii. tehnici de „a treia generaţie", cele mai sensibile: RIA, ELISA şi reacţia de latex aglutinare pasivă inversă xxx).

Sînt de amintit şi tehnicile de „a treia generaţie" utilizate pentru evidenţierea particulelor virale sau a complexelor imune la nivelul hepatocitelor şi în ser: microscopia electronică şi imunomicroscopia electronică. De asemeni imunofluorescenţa care s-a dovedit utilă pentru decelarea AgHBs şi AgHBc în hepatocitele infectate. De dată recentă poate fi evidenţiată şi activitatea ADN-polimerazică, printr-o metodă complicată radioimună, activitate care traduce prezenţa în număr mare a virionilor maturi infecţioşi

---

x) VHB este prezent în sînge din perioada de incubaţie a bolii şi poate persista luni sau ani după vindecare

xx) In reacţia de hemaglutinare pasivă, hematiile, în prealabil tratate cu Cl_3Cr, sînt învelite cu AgHBs purificat iar în reacţia de hemaglutinare pasivă inversă cu anti-HBs

xxx) Este o reacţie rapidă care permite decelarea AgHBs prin utilizarea unor particule de latex polistiren învelite cu anti-HBs

în sînge şi existenţa unor leziuni hepatice active.

In fig.83 este prezentată evoluţia markerilor serologici şi clinici la un bolnav cu hepatită acută de tip B.

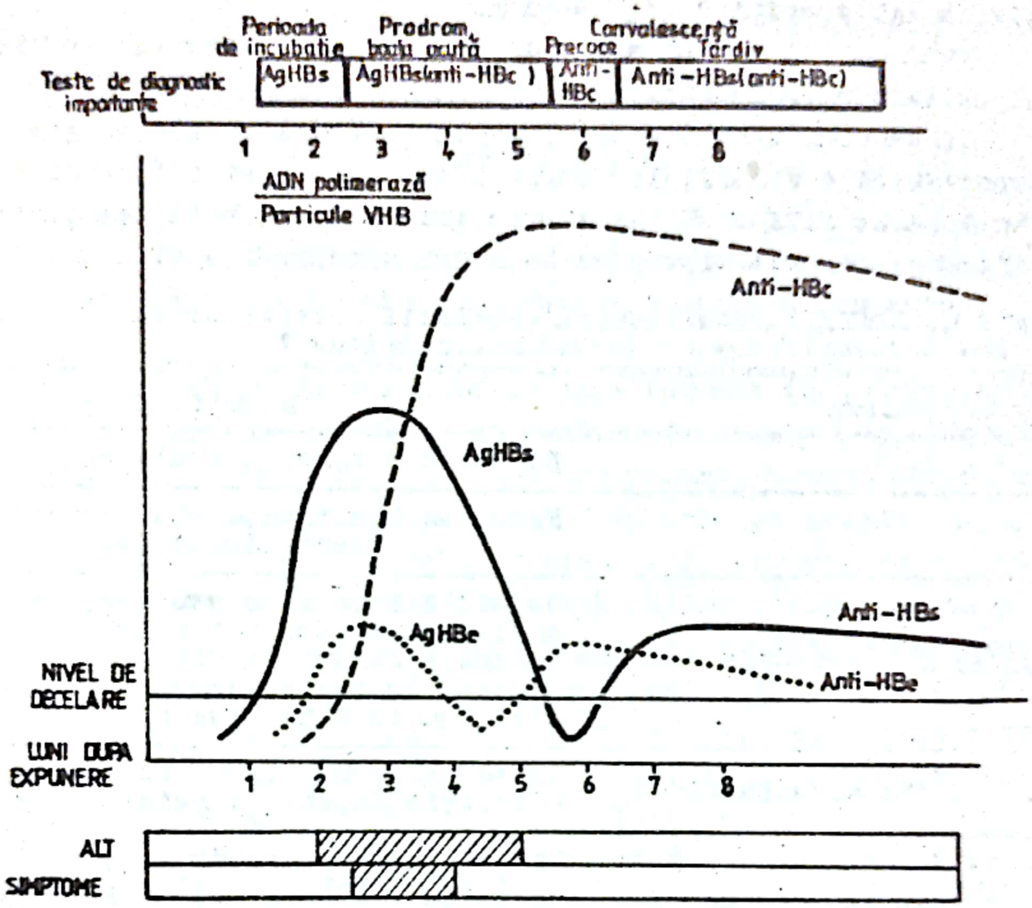


Fig.83 EVOLUTIA UNOR MARKERI SEROLOGICI SI CLINICI IN HEPATITA VIRALA B.(după HOLLINGER FR şi DIENSTAG JL, 1980)

C. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR IN HEPATITA B ASOCIATA CU VIRUSUL DELTA

Virusul hepatitei delta (VHD) este un virus defectiv care are nevoie pentru replicare de funcţia „helper" a VHB. Morfologic se prezintă ca o particulă de cca 36 nm ø, formată dintr-un înveliş care conţine AgHBs şi o componentă internă constituită din antigenul delta (AgHD) şi o moleculă mică de ARN. AgHD este prezent în sînge numai la debutul infecţiei, nu şi la subiectele cronic infec-

Scanned with OKEN Scanner

tate cu virus.

Practic, diagnosticul infecției cu VHD se bazează pe evidențierea anticorpilor anti-HD prin metodele RIA sau ELISA. Se poate măsura conținutul total al anticorpilor sau se poate determina concentrația în IgM specifice (IgM anti-HD).

Prin suprainfectarea celulelor hepatice infectate cu VHB, virusul delta agravează hepatita B.

In tabelul XXVIII este sintetizată semnificația diagnostică și prognostică a diferiților markeri serologici ai infecției cu VHB iar în tabelul XXIX sînt prezentate criteriile serologice pentru identificarea celor 3 tipuri de hepatită virală: A,B și non-A, non-B.

Tabelul XXVIII. Semnificația decelării markerilor serologici ai infecției cu VHB

Marker	Semnificație
AgHBs	Hepatită B activă, acută sau cronică
AgHBs și AgHBe	Hepatită B activă,acută sau cronică, foarte infecțioasă
AgHBs și IgM anti-HBc	Hepatită B în curs sau recentă; anti-HBc singuri pot releva infecția în unele cazuri în care AgHBs este prezent în ser în concentrații prea mici pentru a fi decelat
Anti-HBs (în absența AgHBs)	Infecție cu VHB în antecedente Protecție împotriva reinfecției
Anti-HBe	Prezenți la un purtător de AgHBs conferă sîngelui o infecțiozitate mai redusă

Tabelul XXIX. Criterii serologice pentru diagnosticarea celor 3 tipuri de hepatită

Hepatita A	Prezența de IgM anti-VHA
Hepatita B	Prezența de AgHBs și/sau IgM anti-HBc
Hepatita non-A, non-B	Seronegativitate pentru IgM anti-VHA și pentru AgHBs și/sau IgM anti-HBc

Scanned with OKEN Scanner

XXIX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR IN SINDROMUL DE IMUNODEFICIENTA DOBINDITA

Sindromul de imunodeficiență dobîndită (SIDD) [x] este o infecție virală cu importante implicații socio-economice care, sub forma sa clinică clasică de sindrom complet dezvoltat (expandat), evoluează invariabil către deces în interval de aproximativ 2 ani de la debut [xx]. SIDD este transmis pe cale sexuală (homosexuală și heterosexuală), expunere la sînge și produse din sînge (ex. transfuzii, administrare de droguri pe cale intravenoasă, transplant de organe), precum și de la mamă la copil (intrauterin și perinatal).

Agentul cauzal al SIDD este un virus ARN, cu tropism pentru limfocitele T4 (T-helper), denumit virusul imunodeficienței umane (VIDU) [xxx]. El aparține familiei Retroviridae, numită astfel deoarece virusurile posedă o enzimă - reverstranscriptază (ADN polimerază - ARN dependentă) care, în stadiul inițial al replicării virale, transcrie ARN viral într-un ADN dublu spiral circular care este apoi integrat ca provirus în ADN celular al gazdei.

VIDU, izolat în anul 1983 de o echipă de cercetători francezi condusă de Luc Montagnier și apoi în 1984 de un grup american condus de Robert Gallo, are forma unei sfere cu diametrul de 100 nm. Virionul este alcătuit dintr-un miez (core) cilindric care conține ARN monospiral, reverstranscriptază și proteinele p24 și p18; capsida are simetrie helicală. La exterior se găsește un înveliș lipoproteic în care sînt implantate glicoproteinele(gp) 41 și 120.

---

[x] Cunoscut în literatura de specialitate sub numele de SIDA/AIDS (terminologie franceză și respectiv engleză)

[xx] Pînă în aprilie 1989 au fost comunicate la OMS 151.790 cazuri de SIDD, cifră considerată însă inferioară realității (apreciată la cca 400.000 cazuri)

[xxx] HIV (Human Immunodeficiency Virus) în literatura de specialitate

VIDU este citolitic pentru limfocitele T4, care reprezintă gazda sa celulară specifică, de unde deficitul imun celular creiat ce favorizează apariţia de infecţii oportuniste severe cu protozoare (de ex. pneumonia cu Pneumocystis carinii, toxoplasmoza viscerală), fungi (ex. candidoza bucală, esofagiană, pulmonară, criptococoza SNC), bacterii (ex.micobacterioze pulmonare cu complexul Mycobacterium avium - intracellulare, M.kansasii) x) şi virusuri, în special din familia Herpetoviridae (ex. infecţii diseminate cu Cytomegalovirus sau virusul Varicella-zoster; infecţii cronice, inclusiv bucale, cu virusul Herpes simplex), precum şi dezvoltarea de neoplazii (ex. sarcomul Kaposi, ce poate fi localizat şi la faţă sau în cavitatea bucală, în special palatinal; leucoplazia păroasă a limbii; limfomul primar cerebral) care pot orienta diagnosticul către SIDD.

Infecţia evoluează în 4 stadii:

- stadiul de purtător asimptomatic. Persoana infectată xx) are în ser anticorpi anti-VIDU dar este imunologic competentă şi nu există anomalii „in vitro" a limfocitelor T;
- stadiul de supresie imună biologică;
- complexul înrudit cu SIDD (în special limfadenopatia cronică care ar evolua spre SIDD în 10-30% din cazuri. Ganglionii în special afectaţi sînt (în ordinea frecvenţei) cei cervicali, axilari şi submandibulari);
- SIDD complet expandat cu un spectru larg de manifestări clinice care, în funcţie de microbii oportunişti implicaţi, pot fi pulmonare, gastrointestinale, meningo-encefalitice şi febril-ganglionare; la aceste 4 modele de expresie clinică a SIDD trebuie adăugată şi encefalopatia demenţială legată de infecţia directă a sistemului nervos central cu VIDU.

Diagnosticul SIDD se bazează pe date clinice şi epidemiologice, dublate de teste de laborator specifice pentru infecţia cu VIDU, precum şi de investigaţii care să evidenţieze starea de imunodeficienţă

---

x) Studii recente au arătat că în populaţiile unde există o puternică prevalenţă a infecţiei cu M.tuberculosis, tuberculoza este infecţia micobacteriană predominantă la subiectele infectate cu VIDU şi că, contrar micobacteriozelor, tuberculoza este, în general, una din primele, adesea chiar prima manifestare clinică a SIDD

xx) OMS apreciază că în lume există cel puţin 5.000.000 de persoane infectate cu VIDU

cîştigată.

1. Teste de laborator specifice pentru infecţia cu VIDU

Testele de laborator urmăresc evidenţierea virusului (diagnostic virologic) şi/sau a anticorpilor (serodiagnostic).

a. Diagnostic virologic

Diagnosticul virologic constă în izolarea virusului şi decelarea componentelor virale (antigene, acid nucleic provirus, reverstranscriptază) în lichidele şi ţesuturile umane.

Izolarea virusului este posibilă în culturi „in vitro" de limfocite T umane stimulate în creştere de interleukina-2 (vezi cap.XII din curs). Recent, de la un bolnav cu SIDD, a fost obţinută o linie celulară T stabilizată (H9) care permite multiplicarea VIDU şi obţinerea sa în cantităţi mari.

Pentru decelarea antigenelor virale sînt în curs de experimentare unele tehnici radioimune şi imunoenzimatice.

b. Diagnostic serologic

In mod curent diagnosticul etiologic al infecţiei cu VIDU se stabileşte serologic, prin evidenţierea anticorpilor faţă de proteinele specifice virale. Anticorpii apar de obicei în următoarele săptămîni (rar luni) după infecţie şi rămîn decelabili ani de zile, posibil toată viaţa.

In prezent există numeroase tehnici pentru serodiagnosticul SIDD x), cele mai folosite fiind ELISA şi IF. Cînd un ser este în mod repetat pozitiv în ELISA sau IF va fi confirmat printr-un alt test, de obicei WBA sau „immunoblot".

Testul WBA se bazează pe punerea în contact a serului de cercetat cu antigenele virale separate prin electroforeză în coloană de poliacrilamidă şi apoi transferate pe membrană de nitroceluloză („blotting" pe hîrtie). Anticorpii care se leagă la antigenele virale sînt evidenţiaţi printr-o nouă incubare cu antiglobulină, marcată cu enzimă (peroxidază), şi un substrat enzimatic. Serul bolnavilor induce reacţie de culoare la nivelul unde în coloană s-a imobilizat proteina majoră, p24 (componentă a miezului virionului) şi glicoproteina transmembranară, gp 41 (prezentă în învelişul virusului).

---

x) Imunoenzimatice (ELISA); Radioimunoanaliza în fază solidă (SPRIA); Imunofluorescenţa (IF); Radioimunoprecipitarea (RIPA) şi Western blot assay (WBA)

2. Anomalii imunologice

In SIDD sînt prezente tulburări imunologice care se explică prin tropismul major al VIDU pentru limfocitul T4 (helper/inductor). Datorită rolului principal al acestui limfocit în coordonarea răspunsului imun (vezi cap.XII din curs), distrugerea sau dereglarea sa funcţională induce tulburări atît în imunitatea celulară cît şi în cea umorală.

a. Imunitatea mediată celular

- Limfopenie, adesea sub 500/mmc, datorită în special deficitului selectiv în subsetul OKT4^{+} de limfocite T.

- Diminuarea raportului T4:T8 care este subunitar ca urmare a scăderii limfocitelor T4. De aici rezultă dezechilibrul între activare şi supresie în favoarea supresiei.

- Diminuarea răspunsurilor cutanate de hipersensibilizare întîrziată (anergie cutanată la tuberculină, candidină etc.). „In vitro" sînt deprimate răspunsurile proliferative la antigene şi mitogeni (capacitate scăzută de transformare blastică a limfocitelor T); de asemeni este redusă funcţia citotoxică specifică a limfocitelor T faţă de antigene virale, precum şi capacitatea acestora de cooperare cu limfocitele B.

- Este deprimată activitatea celulelor natural killer (NK).

b. Imunitatea umorală

- Activare importantă policlonală a limfocitelor B care se traduce prin nivele serice crescute de Ig (în special IgG şi IgA) şi de complexe imune.

- „In vitro" limfocitele B nu răspund la semnalele normale de activare iar „in vivo" sînt incapabile de a răspunde prin anticorpi la antigene noi T-dependente.

3. Alţi markeri serologici de alterare a funcţiilor imune

- Nivele crescute de beta-2-microglobulină, ca urmare a distrugerii limfocitelor T.

- Creşterea nivelului de interferon alfa, labil la pH acid.

De reţinut că anomaliile imunologice descrise mai sus nu sînt prezente la toţi bolnavii cu SIDD şi că ele singure nu au valoare diagnostică (deoarece există şi alte cauze clinice de imunodepresie).

Scanned with OKEN Scanner

NOTIUNI PRACTICE DE PARAZITOLOGIE

Scanned with OKEN Scanner

XXX. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE PROTOZOARE

Protozoarele sînt organisme unicelulare cu structură eucariotă încadrate în regnul Animal (subregnul Protozoa).

Au dimensiuni cuprinse între 20-200 µm şi un ciclu evolutiv care prezintă 2 stadii: vegetativ (trofozoit) şi chistic.

Mobilitatea protozoarelor este asigurată de pseudopode, flageli sau cili.

Majoritatea protozoarelor se înmulţesc atît asexuat cît şi sexuat.

Protozoarele cu importanţă medicală se clasifică în 3 încrengături:

- Sarcomastigophora care cuprinde microorganisme deplasabile prin pseudopode sau flageli - amibe şi respectiv flagelate;
- Apicomplexa care include protozoare imobile - sporozoare;
- Ciliophora care conţine protozoare acoperite cu cili - ciliate.

I. SARCOMASTIGOPHORA

Sarcomastigophorele sînt protozoare uninucleate mobile, grupate în 2 subîncrengături: Sarcodina şi Mastigophora.

A. SARCODINA

Cuprinde amibe, protozoare lipsite de membrană celulară, deformabile, care se deplasează cu ajutorul unor prelungiri protoplasmatice numite pseudopode.

In subîncrengătura Sarcodina sînt incluse unele amibe patogene, parazite (cu habitat în tractusul digestiv al omului şi a unor animale), genul Entamoeba, sau libere (cu habitat în ape şi soluri umede), genurile Naegleria şi Acanthamoeba [x].

---

[x] Genurile Naegleria şi Acanthamoeba sînt agenţii etiologici ai meningoencefalitei amibiene primare, boală rar semnalată în Europa

In genul Entamoeba se încadrează specii parazite cu localizare intestinală - E.hystolitica, agentul cauzal al dizenteriei amibiene, boală în special întîlnită în țările tropicale, și specii comensale cu localizare bucală - E.gingivalis.

EVIDENȚIEREA ENTAMOEBA GINGIVALIS

E.gingivalis este prezentă la nivelul gingiei inflamate, în cariile dentare și în placa dentară, la aproximativ 20-30% din persoane.

Deoarece poate întreține sau exacerba unele infecții bacteriene ale cavității bucale, în special parodontitele marginale cronice, evidențierea sa impune aplicarea tratamentului antiparazitar corespunzător.

Diagnostic parazitologic

E.gingivalis prezintă numai formă vegetativă. Trofozoitul, rotund sau ovalar, măsurînd între 6-32 /um, are citoplasma net diferențiată într-o zonă externă hialină, ectoplasma și o zonă internă, granulară, endoplasma. In citoplasmă se găsesc numeroase vacuole cu elemente fagocitate: leucocite, celule epiteliale ale mucoasei bucale, bacterii, uneori hematii.

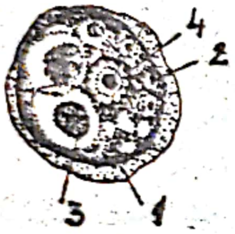


Fig.84 E.gingivalis
1=ectoplasma; 2=vacuole cu bacterii; 3=leucocite fagocitate; 4=nucleu

Nucleul sferic, situat paracentral, posedă un cariosom excentric; cromatina nucleară este dispusă în mici granule pe fața internă a membranei nucleare (fig.84).

i. Examenul microscopic. E.gingivalis poate fi vizualizată la examenul microscopic al secreției gingivale, în preparat umed cu adaos de Lugol sau în frotiu colorat May-Grünwald-Giemsa (MGG).

ii. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. E.gingivalis este sensibilă la derivații imidazolici (metronidazol, tinidazol).

B. MASTIGOPHORA

Mastigophorele sînt protozoare a căror mobilitate este asigurată de organite de locomoție - flageli; unele posedă și o membrană ondulantă. Corpul acestor paraziți este delimitat la exterior de o condensare a protoplasmei numită periplast.

Flagelatele de interes medical se clasifică în 2 grupuri:

- cavitare, cu localizare intestinală, bucală și genito-urinară, genurile Trichomonas și Giardia;

- sangvine şi tisulare, întîlnite în zonele tropicale, genurile Tripanosoma şi Leishmania.

1. EVIDENTIEREA TRICHOMONAS TENAX

Tr.tenax este un comensal al cavităţii bucale; starea de portaj în masa populaţiei, în unele zone geografice, poate ajunge pînă la 50%; are aceeaşi semnificaţie patogenă ca şi E.gingivalis.

Diagnostic parazitologic

Tr.tenax prezintă numai formă vegetativă.

i. Examenul microscopic al frotiurilor din secreţia gingivală, produs din caria dentară etc., colorate MGG poate evidenţia trofozoitul, cel mai adesea piriform, măsurînd 5-12 µm 1/2-8 µm ø.

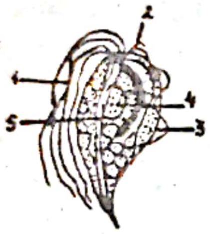


Fig.85 Tr.tenax
1=flageli; 2=blefaroplaşti; 3=m. ondulantă; 4=nucleu; 5=axostil

Posedă 4 flageli anteriori liberi, şi un flagel recurent care mergînd pe sub periplast, îl ridică, formînd o membrană ondulantă care se întinde pînă la jumătatea corpului. Flagelii îşi au originea în nişte organite citoplasmatice, blefaroplaşti.

Nucleul mare, cu relativ puţine granulaţii cromatice, este situat la polul anterior al trofozoitului. Trofozoitul prezintă un axostil, formaţiune tubulară rigidă, cu rol de susţinere, care porneşte din zona blefaroplaştilor şi străbate axial corpul celular, prelungindu-se mult în afara acestuia (fig.85). La baza membranei ondulante se află un element de întărire, costa.

La polul anterior al parazitului, ventral, se află o mică deschidere bucală, citostomul.

ii. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. Tr.tenax este sensibil la derivaţii imidazolici (metronidazol, tinidazol).

2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TRICHOMONIAZEI GENITO-URINARE

Trichomoniaza genito-urinară, boală venerică interesînd ambele sexe, este cauzată de Tr.vaginalis.

La femeie, trichomoniaza evoluează ca o vulvo-vaginită acută, manifestată prin prurit vulvo-vaginal intens, scurgeri vaginale extrem de abundente şi uneori disurie. Mucoasa vaginală este hiperemiată şi tumefiată. Peste 90% din femeile cu trichomoniază au eroziuni ale colului uterin ce predispun la carcinom cervical.

La bărbat, infecţia este frecvent asimptomatică. Numai 10-20% din bărbaţii infectaţi prezintă uretrită subacută manifestată clinic prin secreţie uretrală purulentă, redusă cantitativ şi arsuri micţionale. După cronicizare, scurgerea uretrală ia aspect de „picătură matinală".

Infecţia cu Tr.vaginalis poate determina, la bărbat, prostatită şi rareori sterilitate reversibilă.

Diagnosticul infecţiei cu Tr.vaginalis se stabileşte, de obicei, parazitologic.

a. Diagnostic parazitologic

Evidenţierea parazitului se poate face prin examen microscopic şi, în unele cazuri, prin cultură, în secreţia vaginală sau sedimentul urinar la femeie şi în secreţia uretrală, obişnuit după masaj prostatic, la bărbat.

i. Examenul microscopic. Tr.vaginalis se prezintă numai sub formă de trofozoit cu morfologie asemănătoare speciei tenax de care se diferenţiază prin: dimensiuni mai mari, 7-23 µm 1/5-12 µm Ø; membrana ondulantă este mai scurtă (se întinde numai în 1/3 anterioară a corpului); axostilul este alcătuit în partea anterioară din cîteva fibrile; cromatina nucleară este distribuită uniform; citoplasma conţine numeroase granule siderofile situate în jurul costei şi axostilului (fig.86).

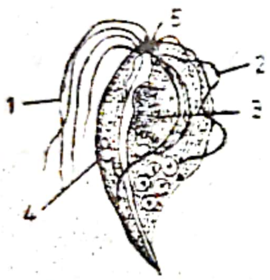


Fig.86 Tr.vaginalis
1=flageli; 2=m.ondulantă; 3=nucleu; 4=axostil; 5=blefaroplaşti

Vizualizarea trofozoiţilor se face în preparat proaspăt sau frotiu colorat MGG.

ii. Cultura x) este cea mai bună metodă de precizare a diagnosticului atît la femeie cît şi la bărbat. Este indicată şi pentru controlul vindecării după tratament

iii. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. Tr.vaginalis este sensibil la derivaţii imidazolici (metronidazol, tinidazol, clotrimazol etc.).

---

x) Mediul Magara (lichid), mediul Johnson şi Trussel (solid) conţin peptonă, cisteină, maltoză, extract de ficat, soluţie Ringer, ser de cal, antibiotice (penicilină, streptomicină, cloramfenicol). Cultivarea se face în condiţii de anaerobioză

b. Diagnostic serologic

Evidențierea anticorpilor anti-*Tr.vaginalis* cu specificitate înaltă se poate face printr-un test de hemaglutinare indirectă. Se utilizează ca antigen o mixtură de glicoproteină obținută din variate tipuri serologice, adsorbită pe hematii de oaie.

3. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL GIARDIOZEI

Giardioza este o parazitoză cauzată de *Giardia lamblia*, protozoar ce se localizează în criptele glandulare ale mucoasei duodeno-jejunale.

Transmiterea chisturilor infecțioase se face direct prin mîini murdare sau prin intermediul alimentelor și apei.

La noi în țară, giardioza este o parazitoză frecventă, cu aspect epidemic în colectivitățile de copii unde nu se respectă regulile de igienă.

La copii, giardioza evoluează ca o boală diareică acută sau cronică conducînd, uneori, la steatoree și sindrom de malabsorbție.

La adult, infecția este adesea asimptomatică. Poate determina boală diareică la călătorii adulți în zonele endemice, contaminarea realizîndu-se prin apă.

Diagnostic parazitologic

G.lamblia se prezintă sub 2 forme: trofozoit și chist, care pot fi evidențiate în materiile fecale sau în lichidul duodenal.

a. Examenul microscopic al materiilor fecale în preparat proaspăt cu adaos de Lugol permite vizualizarea parazitului. In infecțiile acute se pot observa trofozoiții iar în infecțiile cronice și la purtătorii sănătoși chisturile.

Trofozoitul, cu aspectul unei jumătăți de pară tăiată în lungime, are un pol anterior rotunjit și unul posterior ascuțit; măsoară 9-21 μm L/5-15 μm l/2-4 μm Ø. Fața dorsală este convexă iar fața ventrală, plană în 1/2 posterioară, prezintă în 1/2 anterioară un disc adeziv prin care parazitul se atașează la epiteliul mucoasei intestinale.

La polul anterior se găsesc 2 nuclei ovalari situați simetric față de linia mediană, conținînd cîte un cariozom central. Posedă 8 flageli, ce își au originea în 4 perechi de blefaroplaști, dispuși caracteristic, care imprimă parazitului mișcări sacadate „în cădere

de frunză".

Chistul ovalar măsoară 8-12 μm 1/7-10 μm ∅ şi este înconjurat de o membrană dublă. Citoplasma fin granulară conţine 2-4 nuclei situaţi polar şi resturi de flageli grupaţi în fascicule în axul chistului sub forma unei linii curbe sinuoase (fig.87).

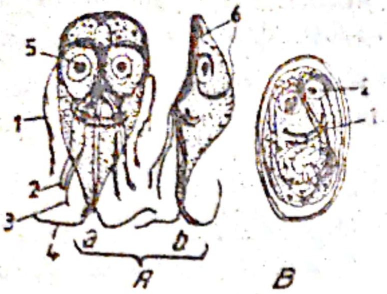


Fig.87 G.lamblia

A.Trofozoit: a.Faţă ventrală; b.Profil
1-4=flageli; 5=nuclei; 6=disc adeziv

B.Chist: 1=resturi de flageli; 2=nuclei

Chisturile sînt elemente infecţioase care se elimină prin materii fecale şi se transmit de la o gazdă la alta prin mîini contaminate, apă, alimente.

Eliminarea intermitentă a chisturilor impune examinarea a 3-4 probe de materii fecale, recoltate la 5-7 zile interval. In cazul unor examene coproparazitologice repetat negative se recurge la examenul lichidului duodenal recoltat cu sonda Einhorn sau prin enterotest.

Biopsia jejunală. In secţiunile histologice obţinute se pot identifica trofozoiţii.

Periajul citologic al duodenului pe cale endoscopică dă rezultate superioare biopsiei.

Contraimunoelectroforeza permite decelarea antigenului de G.lamblia în materii fecale folosind seruri imune cu titruri înalte.

b. Cultura. In laboratoarele utilate, G.lamblia poate fi cultivată axenic în scopul preparării de antigene necesare serodiagnosticului.

c. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. G.lamblia este sensibilă la derivaţii de acridină (mepacrină, atebrină etc.), derivaţii imidazolici (metronidazol, tinidazol etc.) şi derivaţii de nitrofuran (furazolidon, furoxan etc.).

II. APICOMPLEXA

Include protozoare ce posedă, în unele stadii de dezvoltare, un complex apical vizibil la microscopul electronic.

Majoritatea paraziţilor umani din încrengătura Apicomplexa aparţin clasei Sporozoa.

A. SPOROZOA

Sporozoarele sînt paraziţi endocelulari, în general imobili sau cu mobilitate redusă, caracterizaţi prin alternanţa a 2 generaţii: una asexuată (schizogonia) şi alta sexuată (sporogonia), ce survin la aceeaşi gazdă sau la gazde diferite.

Se clasifică în 2 grupuri:

- Sporozoare tisulare: genurile Toxoplasma şi Pneumocystis;
- Sporozoare sangvine: genul Plasmodium.

1. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TOXOPLASMOZEI

Toxoplasmoza este cauzată de *Toxoplasma gondii*, sporozoar cu habitat în celulele sistemului reticuloendotelial, în interiorul căreia se multiplică.

Ciclul evolutiv complet, incluzînd atît multiplicarea asexuată cît şi cea sexuată, are loc numai la pisică. In celulele epiteliale ale ileonului de pisică iau naştere oociştii care sînt eliminaţi cu materiile fecale; în mediul extern ei sporulează şi devin infecţioşi.

La om, mamifere şi păsări se desfăşoară numai stadiul asexuat tradus prin formarea trofozoiţilor şi a chisturilor.

Toxoplasmoza se prezintă sub 2 forme, de origine şi importanţă diferită: toxoplasmoza cîştigată şi toxoplasmoza congenitală.

Toxoplasmoza cîştigată se contractează pe cale digestivă prin ingestia de chişti tisulari, conţinuţi în carnea consumată crudă sau insuficient preparată termic, sau de oocişti, eliminaţi de pisică, care au contaminat fructe sau zarzavaturi.

Toxoplasmoza congenitală este consecinţa transmiterii trofozoiţilor transplacentar de la mame cu infecţii acute, frecvent asimptomatice.

Toxoplasmoza cîştigată evoluează benign la indivizii normali. Ea este cel mai adesea asimptomatică (90% din cazuri) sau se manifestă prin limfadenopatie, mai frecvent fiind implicaţi ganglionii cervicali. La indivizii imunodeficienţi, boala îmbracă însă forme severe, adeseori mortale prin complicaţii cardiace sau meningo-encefalitice.

Toxoplasmoza congenitală poate determina malformaţii variate la copil: hidrocefalie, calcificări intracerebrale, corioretinită, buză de iepure, gură de lup etc.

Diagnosticul etiologic se stabilește, în mod excepțional, prin metode parazitologice și, în mod curent, serologic.

a. Diagnostic parazitologic

Examenul parazitologic constă în evidențierea parazitului în frotiuri efectuate din diferite produse patologice: sînge, l.c.r., suc ganglionar, umoare apoasă, celule parenchimatoase din ficat și splină etc.) și prin inoculare la animale.

i. Examenul microscopic al frotiului colorat MGG evidențiază greu paraziții din cauza numărului lor redus.

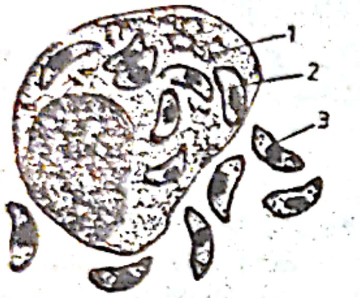


Fig.88 T.gondii
1=macrofag,
2=trofozoit intracelular,
3=trofozoit extracelular.

Trofozoiții situați intra- și extracelular au formă arcuită, cu o extremitate mai rotunjită și alta mai ascuțită; măsoară 4-8 μm 1/2-3 μm Ø. Citoplasma, de culoare albastru pal, conține către polul mai rotunjit un nucleu mare, ovalar, colorat în roșu (fig.88).

Chisturile pot fi evidențiate în frotiuri sau amprente de creier efectuate la necropsie. Au formă rotundă sau ovalară, măsurînd 10-60 μm Ø și conțin 100-300 trofozoiți.

ii. Inocularea la animal. Se recomandă izolarea T.gondii, în special din placentă, pe animale de laborator. Metoda este dificilă, cere mult timp și de aceea este rar utilizată.

Produsul patologic se inoculează intraperitoneal la șoareci albi foarte tineri, indemni de toxoplasmoză. După 7-10 zile se examinează frotiul colorat MGG, efectuat din exsudat peritoneal, pulmon, splină sau ficat. Dacă este negativ se face o trecere la alt șoarece.

Serul animalului inoculat poate fi testat pentru evidențierea anticorpilor anti-T.gondii.

iii. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. T.gondii este sensibilă la pirimetamină (Daraprim) [x)] și sulfamide (sulfadiazină), chimioterapice care acționează sinergic (preparatul Fansidar), la cotrimoxazol, precum și la antibiotice (spiramicină, clindamicină).

---

x) Pirimetamina este contraindicată la gravide

b. Diagnostic serologic

In mod obişnuit, diagnosticul toxoplasmozei se stabileşte serologic. Anticorpii anti-T.gondii pot fi decelaţi prin diferite metode: testul de colorare - liză Sabin-Feldman, testul de imunofluorescenţă indirectă (IFI), testul de hemaglutinare indirectă, reacţia de fixare a complementului, testul ELISA etc.

Testul IFI-IgM (testul Remington) este util în precizarea diagnosticului de toxoplasmoză congenitală la nou-născuţi. De asemenea el este valoros în stabilirea diagnosticului în infecţiile acute.

2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL PNEUMOCISTOZEI

Pneumocistoza, boală respiratorie acută ce interesează sugarii prematuri sau distrofici şi adulţii cu deficienţe imunologice, este cauzată de Pneumocystis carinii.

Chisturile, formele infecţioase ale parazitului, pătrund în organism pe cale respiratorie. Prezenţa şi multiplicarea parazitului în pulmon duc la formarea unui exsudat seros cu numeroase histiocite, limfocite şi mai ales plasmocite în septurile şi alveolele pulmonare (de aici denumirea bolii - pneumonie interstiţială cu plasmocite). In consecinţă, ventilaţia pulmonară este perturbată şi poate surveni moartea prin asfixie.

La imunodeficienţi, pneumocistoza este letală în 100% din cazuri.

Diagnosticul în pneumocistoză se stabileşte numai prin decelarea parazitului în secreţii bronşice sau în pulmon. Cel mai frecvent, diagnosticul de certitudine se precizează post-mortem.

Diagnostic parazitologic

a. Examenul microscopic. Evidenţierea parazitului în frotiuri efectuate din secreţii bronşice (recoltate prin aspiraţie laringo-traheală, lavaj sau periaj bronşic) sau din produse obţinute prin puncţie biopsică sau biopsie pulmonară este dificilă.

P.carinii poate fi identificat, mai uşor, în amprentele pulmonare efectuate la necropsie, la nivelul secţiunilor, după exprimarea exsudatului spumos.

Preparatele se colorează prin metoda MGG.

In frotiuri din secreţia bronşică se pot vizualiza mai ales chisturile, rotunde sau ovalare, net delimitate, cu diametrul de

Scanned with OKEN Scanner

8-10 µm, conținînd 8 corpusculi dispuși în rozetă (fig.89).

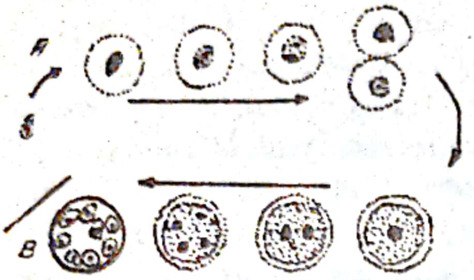


Fig.89 Ciclul evolutiv la P.carinii
A=trofozoiți; B=chisturi

In amprente pulmonare pot fi evidențiate, alături de numeroase chisturi, plaje de trofozoiți liberi sau incluși în macrofage și histiocite. Trofozoiții sînt ovalari, piriformi sau falciformi, măsoară 1-2 µm Ø (formele tinere) sau 2-4 µm Ø (formele adulte) și prezintă un nucleu punctiform.

Examenul histopatologic permite identificarea chisturilor și a trofozoiților în exsudatul alveolar cu aspect de „fagure de miere", precum și evidențierea reacției interstițiale în care predomină plasmocitele.

b. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. P.carinii este sensibil la derivați de pentamidină (lomidina), Fansidar și, mai ales, cotrimoxazol.

3. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL MALARIEI

Malaria (paludismul) este cauzată de sporozoare din genul Plasmodium și transmisă omului prin înțepătura țînțarului anofel femel.

Se cunosc 4 specii parazite la om: Pl.falciparum, Pl.vivax, Pl.malariae și Pl.ovale, primele 2 specii fiind mai frecvent implicate în infecții.

Malaria este o boală endemo-epidemică în regiunile tropicale, constituind o importantă problemă de sănătate publică.

La noi în țară malaria a fost eradicată; pot apare totuși cazuri sporadice de import sau consecutiv transfuziei de sînge de la donatori infestați.

Plasmodiile necesită pentru dezvoltare 2 gazde: una vertebrată (omul), la care are loc înmulțirea asexuată sau schizogonică și alta nevertebrată (țînțarul Anopheles femel, vectorul paraziților), la care se desfășoară evoluția sexuată sau sporogonică.

Ciclul schizogonic cuprinde 2 stadii:

- exoeritrocitar, în care parazitul se multiplică asexuat în țesutul hepatic;

- eritrocitar, în care parazitul se înmulţeşte activ în hematii ajungînd la formele presexuate care vor evolua în organismul vectorului.

Diagnosticul de laborator al malariei se stabileşte parazitologic şi rareori serologic.

a. <u>Diagnostic parazitologic</u>

Este metoda curentă de stabilire a diagnosticului în malarie.

1. <u>Examenul microscopic</u>. Sîngele recoltat din pulpa degetului (sau lobulul urechii) în timpul sau imediat după accesul febril este examinat în <u>picătură groasă</u> şi <u>frotiu</u>. Se studiază întîi picătura groasă (colorată Giemsa) deoarece permite evidenţierea parazitului şi în cazuri de parazitemie redusă. Apoi se examinează frotiul (colorat MGG) x) care permite identificarea speciei, necesară pentru prognostic şi tratament.

Formele eritrocitare ale parazitului sînt (fig.90):

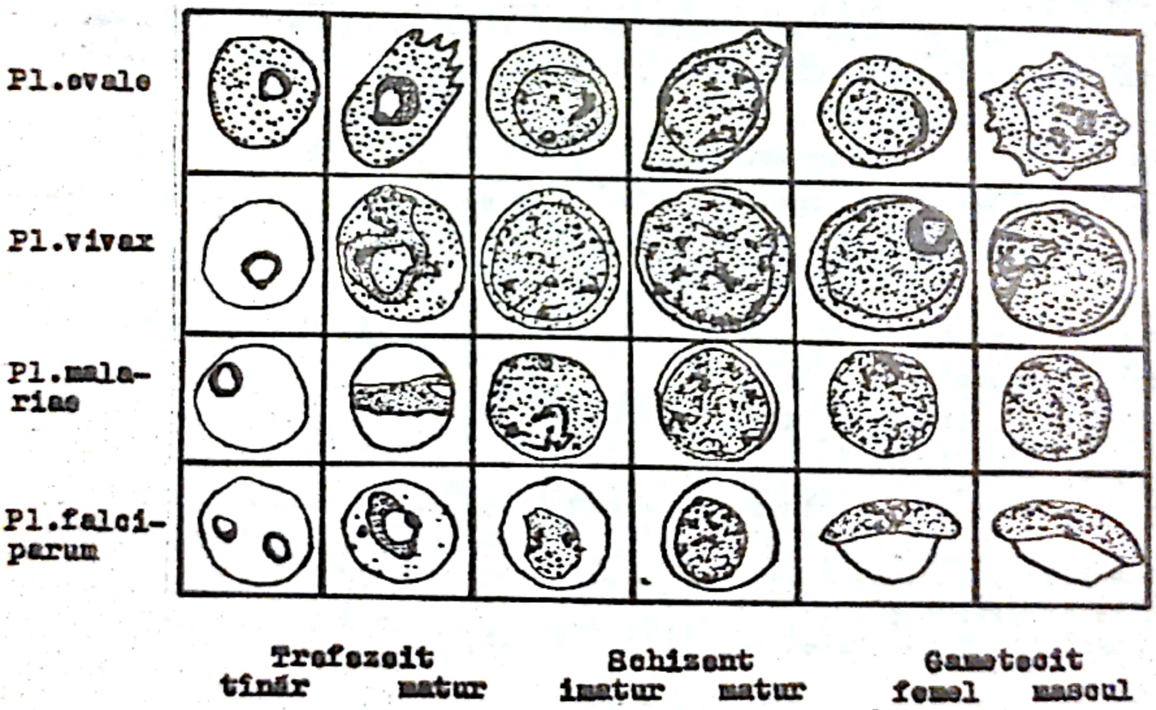


Fig.90 Forme eritrocitare la <u>Plasmodium</u>

- <u>inelul</u> (trofozoitul tînăr), care prezintă citoplasma sub

---

x) In coloraţia MGG nucleul parazitului este roşu iar citoplasma albastră-deschis

formă de arc și un nucleu punctiform situat la unirea celor două capete;

- amiba (trofozoitul matur), cu citoplasma mai abundentă și mai compactă, uneori cu pseudopode, conținînd pigment malaric; are un nucleu excentric sau central;

- rozeta, cu nucleul divizat în 8-32 segmente și citoplasma individualizată în jurul fiecăruia - se formează merozoiții (numărul merozoiților este caracteristic pentru fiecare specie);

- gametociții femeli și masculi, elemente presexuate care apar după cîteva cicluri eritrocitare, se diferențiază prin afinitățile tinctoriale, dispoziția nucleului și a pigmentului (vezi fig.90); ei constituie punctul de plecare al unui nou ciclu de viață, sexuat (sporogonic), care se desfășoară în organismul țînțarului, ducînd la formarea de sporozoiți care se acumulează în glandele salivare ale țînțarului de unde vor fi inoculați la om prin înțepare.

Diagnosticul de specie se stabilește după aspectul hematiei parazitate (formă, dimensiuni, granulații) și caracterele morfologice ale parazitului.

Diagnosticul de specie Pl.falciparum

- hematia parazitată are formă și dimensiuni normale; conține puține pete roșii, numite petele lui Maurer;

- inelele sînt foarte mici, ocupînd 1/6 din hematie, cu citoplasma albastră și 1-2 nuclei; uneori se găsesc cîte 2-3 inele într-o hematie;

- trofozoitul matur, de formă amiboidă, conține numeroase granule fine de pigment cafeniu închis;

- rozeta prezintă 18-32 merozoiți dispuși sub formă de mură;

- gametociții au formă semilunară (falciformă); elementele femele cu citoplasma albastră și nucleul compact iar cele mascule citoplasma roșu-violet și nucleul difuz, înconjurat de pigment malaric.

In sîngele periferic se găsesc, de obicei, inele și gametociți. In infecții foarte grave pot apare și celelalte forme.

Diagnosticul de specie Pl.vivax

- hematia parazitată este hipertrofiată, palidă, cu granulații mari de culoare roz, numite granulații Schüffner;

- inelul ocupă 1/4-2/3 din hematie;
- amiba, neregulată, cu pseudopode, are o citoplasmă abundentă şi un nucleu granular de culoare neagră;
- rozeta are 12-18 merozoiţi dispuşi sub formă de mură;
- gametociţii sferici sau ovalari, mai mari ca hematia normală, au nucleul triunghiular; acesta este excentric la gametocitul femel şi difuz, situat central, la gametocitul mascul.

Diagnosticul de specie Pl.ovale

- hematia parazitată hipertrofiată are formă ovalară, este franjată la capete şi conţine granulaţii Schüfner;
- inelul are acelaşi aspect ca la Pl.vivax;
- trofozoitul matur este rotund, compact, conţine puţine granule de pigment brun;
- rozeta prezintă 8-18 merozoiţi;
- gametociţii au acelaşi aspect ca la Pl.vivax.

Diagnosticul de specie Pl.malariae

- hematia parazitată are formă şi dimensiuni normale sau este puţin retractată, cu granulaţii fine, numite Ziemann, vizibile numai la coloraţii speciale;
- inelul ocupă 1/4 din hematie;
- trofozoitul matur are aspect de bandă iar citoplasma conţine un pigment granular de culoare neagră;
- rozeta are 8-12 merozoiţi, dispuşi ca petalele unei flori (margaretă);
- gametociţii, ovalari sau rotunzi, sînt mai mici ca hematia parazitată şi au aceeaşi structură ca cei de Pl.vivax.

ii. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. Plasmodiile sînt sensibile la medicamente din grupul 4-aminochinoleine (clorochina), 8-aminochinoleine (primachina), diamino-pirimidine (pirimetamina); administrate împreună se completează reciproc, pentru a combate toate cele 4 specii de plasmodii în toate stadiile de evoluţie.

b. Diagnostic serologic

Se utilizează testul IFI pentru cercetarea anticorpilor la persoane fără semne clinice de paludism. Testul se pozitivează la 2 săptămîni după apariţia parazitului în sînge şi se menţine pozitiv timp îndelungat. Antigenul folosit este reprezentat de froti-

uri de sînge parazitat cu diferite specii de plasmodii.

Serodiagnosticul nu poate înlocui cercetarea directă a parazitului în sînge.

III. CILIOPHORA

Include protozoare evoluate al căror corp acoperit cu o cuticulă prezintă numeroşi cili cu rol în mişcare şi în captarea hranei. Balantidium coli este singura specie cu importanţă medicală.

1. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL BALANTIDIOZEI

Balantidioza sau dizenteria balantidiană este cauzată de B.coli, protozoar cu habitat în colon la porc. La om, balantidioza survine rar, ca boală profesională la crescătorii de porci, prin consum de alimente sau apă contaminate cu chisturi sau prin manipularea viscerelor animalelor bolnave.

Infecţia cu B.coli este, în mod obişnuit, asimptomatică; uneori, evoluează sub formă de colită cronică sau dizenterie.

Diagnosticul etiologic se stabileşte parazitologic.

Diagnostic parazitologic

a. Examenul microscopic al preparatului proaspăt sau al frotiului colorat MGG efectuate din materiile fecale proaspăt recoltate (în interval de 1 oră de la emisie) poate evidenţia trofozoiţii şi rar chisturile.

Trofozoitul, ovalar, cu polul anterior uşor ascuţit şi cel posterior rotunjit, măsoară 50-200 µm /40-70 µm Ø. Suprafaţa corpului este acoperită cu cili scurţi, dispuşi pe linii longitudinale uşor oblice. La polul anterior prezintă o înfundătură longitudinală, şanţul citostomal, în care se deschide orificiul bucal, citostomul. Cilii din jurul şanţului citostomal sînt mai lungi, cili adorali.

Citoplasma conţine vacuole cu incluzii şi 2 nuclei: un nucleu mare, reniform – nucleu vegetativ şi altul mai mic sferic, aşezat în concavitatea primului, cu rol în reproducere (fig.91).

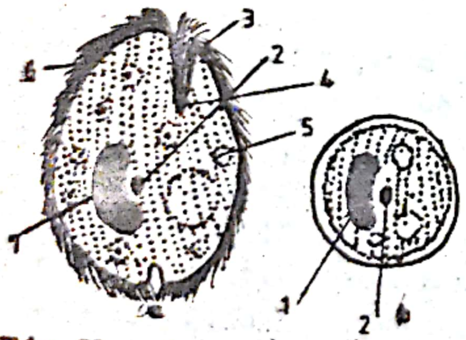


Fig.91 B.coli
a.Trofozoit: 1=macronucleu; 2=micronucleu; 3=şanţ citostomal; 4=citostom; 5=vacuole; 6=cili.
b.Chist: 1=macronucleu; 2=micronucleu.

<u>Chistul</u>, sferic, cu o membrană dublă, măsoară 40-70 µm ø. Conţine un macronucleu reniform, un micronucleu sferic şi o vacuolă cu glicogen (vezi fig.91).

b. <u>Sensibilitatea la medicamente antiparazitare</u>. <u>B.coli</u> este sensibil la derivaţi arsenicali (carbarson, difetarson), derivaţi imidazolici (metronidazol), antibiotice (oxitetraciclină, paromomicină).

Scanned with OKEN Scanner

XXXI. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECTIILOR CAUZATE DE HELMINTI

Helminţii sau viermii sînt metazoare pluricelulare, cu simetrie bilaterală, lipsiţi de organe de mişcare, locomoţia realizîndu-se prin ondulaţiile corpului.

Helminţii cu importanţă medicală se încadrează în 2 încrengături:

- Plathelmintes care cuprinde viermi plaţi;
- Nemathelmintes care cuprinde viermi cilindrici.

I. PLATHELMINTES

Plathelminţii sînt viermi plaţi, turtiţi dorso-ventral, hermafrodiţi, a căror cavitate generală este plină cu ţesut mezenchimatos. Plathelminţii paraziţi la om se încadrează în 2 clase: Trematoda şi Cestoda.

A. TREMATODA

Cuprinde viermi nesegmentaţi, cu aspect foliaceu, de dimensiuni mici (1 mm la cîţiva cm), avînd ca organe de fixare ventuze. Prezintă un tub digestiv incomplet. Majoritatea sînt hermafrodiţi.

Dintre trematode numai distomienii au importanţă medicală. La om, ei pot parazita sîngele, pulmonul, intestinul sau ficatul.

Distomienii hepatici (Fasciola hepatica, Dicrocoelium lanceatum) au o răspîndire universală.

Distomienii sangvini (Schistosoma), pulmonari (Paragonimus), intestinali (Clonorchis) se întîlnesc numai în zonele tropicale.

B. CESTODA

Cestodele sau teniile sînt viermi pangliciformi; au corpul segmentat format din 3 părţi: scolex (cap) mic, organ de ataşare la mucoasa intestinală prevăzut cu ventuze şi/sau croşete, gît subţire, de 2-3 mm, regiune de creştere, şi strobila (corp) alcătuită

din segmente numite proglote. Proglotele tinere din apropierea gîtului au organele interne abia schițate. Proglotele mature, situate la mijlocul strobilei includ organele de reproducere masculo și femele. Proglotele bătrîne situate terminal, mai mult lungi decît late, conțin numai uterul plin cu ouă. Forma uterului este caracteristică speciei, constituind un important criteriu de diagnostic. Proglotele terminale se pot detașa de restul strobilei în intestin și elimina activ (în afara scaunului) sau pasiv (o dată cu scaunul). Ouăle embrionate ajung în mediul extern și ingerate de gazda intermediară (porcul pentru Taenia solium și bovideele pentru Taenia saginata) evoluează formînd larvele - cisticercii, localizate în special în mușchi.

Cestodele, atît în stadiul adult cît și în stadiul larvar, cauzează la om boli numite cestodoze. Adulții habitează în intestinul subțire iar larvele în diferite organe și țesuturi.

Redăm, în continuare, diagnosticul de laborator al cestodozelor determinate de paraziți adulți (Taenia solium, Taenia saginata) și de unele larve de cestode (Cysticercus și forma larvară a teniei Echinococcus granulosus).

1. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TENIAZEI

Teniaza este cauzată de cestode adulte din genul Taenia, cu habitat în intestinul subțire. Se pot diferenția 2 specii: T.solium și T.saginata.

Teniaza se produce prin ingestia de carne crudă sau insuficient prelucrată termic, de vită (T.saginata) sau de porc (T.solium), ce conține stadiul larvar al parazitului, cisticercii.

Teniaza are răspîndire universală. Boala cauzată de T.saginata este mai frecventă decît cea produsă de T.solium care lipsește la populația mahomedană din Africa și Asia.

Teniaza este asimptomatică în 25-30% din cazuri, manifestîndu-se doar prin eliminare de proglote, fapt ce determină pacientul să se adreseze medicului. Uneori, teniazele evoluează cu tulburări digestive: modificări de apetit (bulimie sau anorexie), dureri epigastrice sau în hipocondrul drept (asemănătoare cu cele din ulcerul gastro-duodenal), grețuri, vărsături, regurgitații, diaree sau constipație. Se pot adăuga tulburări neurologice și psihice: ame-

ţeli, lipotimii, tulburări de comportament, tulburări de memorie, stări de agitaţie, insomnii, crize epileptiforme etc. Uneori apar manifestări alergice: prurit anal sau nasal, urticarie etc.

In teniaze diagnosticul de certitudine se stabileşte parazitologic.

<u>Diagnostic parazitologic</u>

Examenul parazitologic se bazează pe decelarea proglotelor, pe care bolnavul le elimină cu scaunul sau între scaune, şi extrem de rar a ouălor în materiile fecale.

i. <u>Examenul unui lanţ de proglote</u> se face cu ochiul liber sau cu lupa. Dacă lanţul conţine mai mult de 10 proglote se evidenţiază alternanţa porilor genitali (proeminenţe mici, cît o gămălie de bold, situate pe părţile laterale ale proglotelor).

ii. <u>Examenul unei proglote</u> se realizează cu lupa. Se transparentizează proglota prin presare între 2 lame, cu ajutorul unei cleme metalice. Se evidenţiază forma ramificaţiilor uterine şi numărul lor.

iii. <u>Examenul scolexului</u> se practică pentru controlul vindecării după tratament. Tenia se poate elimina în întregime după tratament antiparazitar corespunzător. Se pune într-o cutie Petri cu apă iar cu o pensă se derulează cîte puţin corpul teniei în altă cutie Petri, pornind de la partea mai lată la cea mai subţire; la capătul cel mai subţire se poate vedea o formaţiune de 1-2 mm ø, pigmentată, scolexul. Se examinează cu lupa sau la microscop cu obiectiv 10x.

iv. <u>Examenul coproparazitologic</u> este, de regulă, negativ. Extrem de rar, după distrugerea unei proglote bătrîne în intestin, se pot evidenţia ouăle în materiile fecale, prin examen microscopic direct sau după concentrarea lor.

Ouăle de <u>T.saginata</u> pot fi vizualizate după prelevare perianală cu bagheta de celofan, metoda Hall (vezi oxiuroza).

Diagnosticul de specie, necesar pentru conduita terapeutică, se stabileşte după aspectul scolexului, dispoziţia porilor genitali la nivelul strobilei, numărul şi tipul ramificaţiilor uterine în proglotele bătrîne.

<u>Diagnosticul de specie T.saginata</u>

<u>T.saginata</u> măsoară 4-10 m lungime.

- <u>Scolexul</u>, piriform, are 1-2 mm ø şi prezintă 4 ventuze

eliptice; este lipsit de croșete (de aceea parazitul se numește și tenia neînarmată, T.inermis).

Fig.92 T.saginata
1=scolex; 2=ou;
3=proglotă bătrînă

- Strobila, este alcătuită din cca 2000 de proglote dreptunghiulare, mai mult lungi decît late, opace, musculoase; porii genitali au o dispoziție neregulat alternă.

- Proglotele bătrîne, măsoară 2 cm 1/ 7 mm Ø; uterul lor prezintă ramificații numeroase (20-30), divizate dichotomic. Proglotele bătrîne se detașează de strobilă și prin mișcări de reptație pot părăsi intestinul, forțînd anusul, eliminîndu-se în afara defecației.

- Oul, ovalar, conține un embrion hexacant (cu 6 cîrlige); este înconjurat de o membrană groasă cu structură radiară și de o membrană externă subțire, transparentă (fig.92).

In materiile fecale, membrana externă se distruge; rămîne embrioforul de 40-50 um Ø alcătuit din embrionul hexacant, înconjurat de coaja striată radiară.

Diagnosticul de specie T.solium

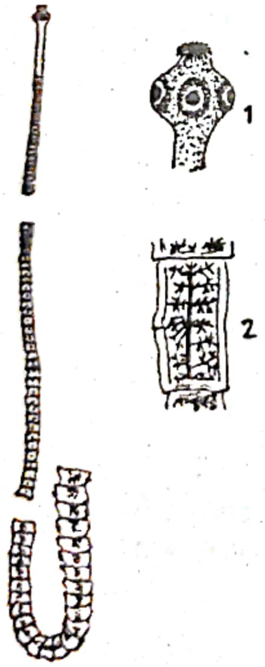


Fig.93 T.solium
1=scolex; 2=proglotă bătrînă

T.solium măsoară 3-5 m lungime.

- Scolexul, de 1 mm Ø, globulos, prezintă 4 ventuze sferice și un rostru prevăzut cu 2 coroane de croșete (de aceea se numește și T.armata).

- Strobila, este alcătuită din cca 1000 de proglote mici, fine, transparente; porii genitali alternează regulat.

- Proglotele bătrîne, măsoară 0,5-1 cm 1; se elimină, de regulă, grupate cîte 5-10, în scurte lanțuri, pasiv, numai cu scaunul. Ramificațiile uterine sînt mai puțin numeroase (7-10) și se divid dendritic (fig.93).

- Oul, cu aceeași structură ca a celui de T.saginata, de care este greu de diferențiat, este mai mic, sferic, cu membrana internă mai fină.

Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. Ambele specii de tenii sînt sensibile la derivaţi acridinici (mepacrina), niclosamid x) (Yomesan, Fredemin), paromomicină. Recent, praziquantelul (chinolein-pirazină heterociclică) s-a demonstrat activ atît asupra cestodelor în stare adultă cît şi a larvelor.

2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL CISTICERCOZEI

Cisticercoza umană este cauzată de larvele de T.solium (Cysticercus cellulosae) şi, în mod excepţional, de larvele de T.saginata (Cysticercus bovis).

Infecţia se produce prin ingerarea ouălor de tenii o dată cu alimentele, apă, mîini murdare. La purtătorii de paraziţi este posibilă autoinfecţia. Prin vărsături sau regurgitaţii, proglotele bătrîne ajung în stomac unde sînt digerate; embrionii hexacanţi eliberaţi din ou se răspîndesc pe cale sangvină în tot organismul şi se pot localiza în orice ţesut. Mai frecvent se stabilesc în muşchi, ţesut celular subcutanat, ochi, SNC. Larvele, numite cisticerci, se dezvoltă complet în aproximativ 2 luni şi au aspectul unor vezicule ovalare sau sferice semitransparente, măsurînd 1,5/0,7 cm şi conţinînd scolexul teniei respective.

Cisticercoza evoluează benign în localizările musculare şi subcutanate şi foarte grav în cele cerebrale sau oculare.

Diagnosticul cisticercozei se stabileşte parazitologic sau serologic.

a. Diagnostic parazitologic

In cisticercoza subcutanată sau musculară, diagnosticul de certitudine se bazează pe examenul direct macroscopic şi microscopic al unui cisticerc uşor accesibil, extras prin biopsie.

i. Examenul macroscopic şi microscopic. Cisticercul se presează între 2 lame pentru evaginarea scolexului. Morfologia scolexului, similară cu a teniei adulte, indică specia.

ii. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. Cisticercii prezintă o sensibilitate moderată la dietil-carbamazin (Notezin, Loxuran) şi praziquantel (Biltricid), medicamente recomandate în tratamentul cisticercozei cerebrale inoperabile.

---

x) Are rol vermicid şi constituie medicamentul de elecţie

b. Diagnostic serologic

Serodiagnosticul este valoros în cisticercoza cerebrală. Se utilizează imunoelectroforeza, reacţia de precipitare în gel şi,în special, IFI, care este cea mai sensibilă.

c. Diagnostic radiologic

Examenul radiologic evidenţiază cisticercii calcificaţi.

d. Diagnostic oftalmoscopic

Examenul oftalmoscopic permite vizualizarea cisticercului localizat la nivelul ochiului.

3. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL HIDATIDOZEI

Hidatidoza, chistul hidatic sau echinococoza este cauzată de forma larvară a unei tenii mici, de 3-6 mm l, Echinococcus granulosus, cu habitat în intestinul cîinelui. Omul se contaminează cu ouăle acestei tenii prin contact direct cu cîinele tenifer (mîngîierea blănii, lingerea mîinilor de către acesta). Embrionii eliberaţi în intestin, ajung pe cale sangvină în ficat unde se opresc în 60-70% din cazuri. In pulmoni se localizează în 20-30% din cazuri. Numai 10% din embrioni scapă filtrului pulmonar şi pătrund în circulaţia generală, răspîndindu-se în întreg organismul şi putîndu-se fixa în orice organ. Au fost semnalate localizări ale chistului hidatic în teritoriul maxilo-facial. Embrionii se dezvoltă lent dînd naştere unei formaţiuni veziculare, ce conţine un lichid clar, denumită chist hidatic sau hidatidă.

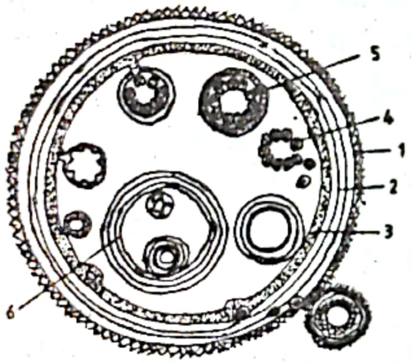


Fig.94 Chist hidatic
1=adventice; 2=cuticulă; 3=membrană proligeră; 4=protoscolex; 5=veziculă proligeră; 6=veziculă fiică

Peretele chistului hidatic (fig. 94) este alcătuit din 2 învelişuri:

- membrana externă, lamelară, anhistă, de 1 mm grosime, cu aspect de albuş de ou fiert, cuticula;
- membrana internă multinucleată, groasă de 25 µm, membrana proligeră sau germinativă, pe care se inseră printr-un pedicul fin numeroase vezicule proligere cu diametrul de 500-1000 µm, conţinînd

fiecare 10-20 protoscolexi.

In chistul hidatic se găsește un lichid clar ce conține vezicule proligere și protoscolexi constituind nisipul hidatic.

In interiorul chistului hidatic se pot forma vezicule fiice, cu aceeași structură ca a hidatidei-mamă.

Diagnosticul în hidatidoză poate fi stabilit serologic și, mai rar, parazitologic.

a. Diagnostic parazitologic

i. Examenul microscopic al lichidului provenit din vomica hidatică pune în evidență unele elemente parazitare: scolexi sau fragmente de membrană chistică care permit stabilirea diagnosticului de certitudine în hidatidoza pulmonară.

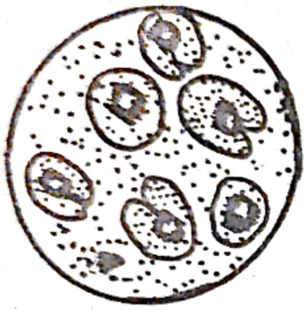


Fig.95 Scolexi din lichidul hidatic.

Scolexii, ovalari, măsoară 150 µm Ø, au un pol mai ascuțit și conțin o coroană de croșete refringente pe un fond incolor fin granulat (fig.95).

ii. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. Chistul hidatic tînăr, în evoluție, este sensibil, uneori, la mebendazol (Vermox) și derivații lui clorurați (fluoromebendazol, flubendazol), precum și la derivați imidazolici (albendazol). Tratamentul medical se aplică numai în hidatidoza inoperabilă.

b. Diagnostic serologic

Anticorpii specifici pot fi evidențiați în titruri variabile în funcție de starea chistului. Cele mai utilizate teste sînt IFI și imunoelectroforeza.

II. NEMATHELMINTES

Nemathelminții (Nematode) sînt viermi cilindrici, nesegmentați, cu cavitatea generală plină cu lichid, tub digestiv complet și sexe separate. După localizare, se pot clasifica în 2 categorii:

- nemathelminți intestinali;
- nemathelminți sangvini și tisulari.

Nemathelminții intestinali în stadiul adult habitează în intestin iar sub formă larvară se găsesc și în alte organe.

Redăm mai jos diagnosticul de laborator al unor helmintiaze

cauzate de nematode mai frecvent întîlnite în țara noastră.

1. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ASCARIDIOZEI

Ascaridioza este cauzată de Ascaris lumbricoides, cel mai mare nematod parazit la om; măsoară 20-30 cm. In stadiul adult habitează în intestinul subțire iar în stadiul larvar în pulmoni.

A.lumbricoides este cel mai „popular" vierme, avînd o răspîndire universală (afectează 1/4 din populația globului, în special copiii). In regiuni cu sanitație deficitară, parazitarea poate atinge procente de 100%.

Omul se infestează prin ingerarea ouălor infectante x) o dată cu apa sau alimentele (fructe, zarzavaturi) contaminate. In duoden, larvele eclozează. Ele migrează apoi prin peretele intestinal, ajung prin circulația portă în ficat, inima dreaptă și prin vasele pulmonare în țesutul interalveolar pulmonar. După dezvoltare completă rup țesuturile și cad în alveole, migrează în căile respiratorii superioare, apoi spre esofag și de aici sînt înghițite și ajung din nou în intestinul subțire unde, în 3-4 săptămîni, devin adulți. Femelele adulte elimină cca 200.000 ouă/zi,

Ascaridioza intestinală, determinată de viermii adulți, se manifestă prin anorexie, dureri abdominale, balonări, diaree, manifestări alergice (edem Quincke, urticarie), tulburări nervoase, în special la copii (somn agitat, iritabilitate, uneori convulsii). In infecțiile masive pot surveni complicații grave ca urmare a invaziei căilor biliare (icter mecanic, abces hepatic), canalului Wirsung (pancreatită acută) sau apendicelui (apendicită acută hemoragică sau purulentă); de asemeni se pot produce ocluzii intestinale provocate prin ghem de ascarizi, volvulus, hernie strangulată.

Ascaridioza larvară se manifestă prin sindromul Loeffler caracterizat prin opacități pulmonare fugace, tuse uscată și febră moderată. Eozinofilia atinge valori de 40-60%.

Diagnosticul etiologic se stabilește parazitologic.

Diagnostic parazitologic

a. Examenul microscopic al sputei sau lichidului de spălătură bronșică poate vizualiza larvele în stadiul pulmonar.

---

x) Ouăle eliminate cu materiile fecale sînt neembrionate și neinfecțioase; ele embrionează pe sol devenind infecțioase (A.lumbricoides este un geohelmint)

In ascaridioza intestinală, examenul microscopic al materiilor fecale poate evidenţia prezenţa ouălor.

Oul, măsurînd 50-70 /um l/40-60 /um ⌀, este ovalar cu un înveliş extern gros, albuminos, mamelonat, şi un înveliş intern subţire, neted, de natură chitinoasă. In interior conţine o masă granulară, vitelină care umple în întregime oul nefecundat şi este retractată central la oul fecundat. Ouăle semidecorticate sînt ouă fertile sau nefertile lipsite de învelişul extern albuminos (fig.96).

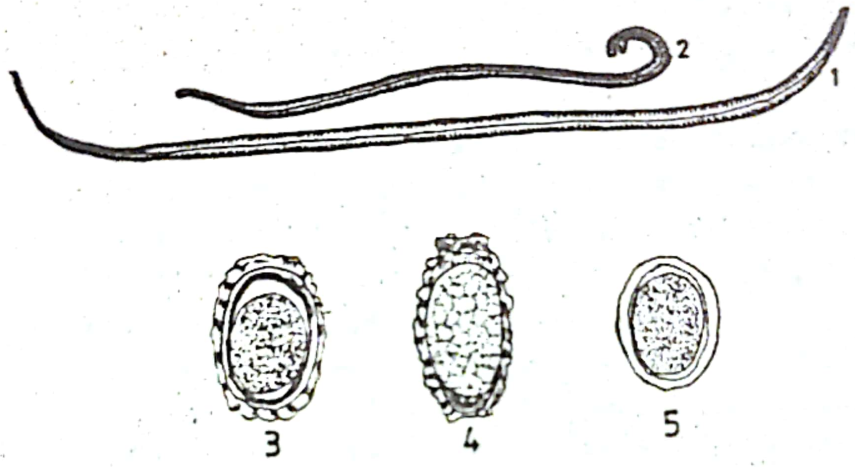


Fig.96 A.lumbricoides

1=femela; 2=masculul; 3=ou fertilizat; 4= ou nefertilizat; 5=ou semidecorticat.

Ouăle sînt incolore în momentul pontei şi devin brune în cursul eliminării datorită pigmenţilor din materiile fecale.

Adulţii se pot elimina, anal sau bucal, spontan sau după tratament antihelmintic corespunzător. Sînt viermi cilindrici, de culoare alb-roz, ascuţiţi la ambele capete. La extremitatea anterioară se află gura cu trei buze prevăzute pe margini cu dinţi chitinoşi. Femela măsoară 20-40 cm lungime iar masculul 17 cm; extremitatea posterioară a masculului este curbată ventral şi prezintă 2 spiculi (vezi fig.96).

b. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. A.lumbricoides este sensibil la săruri de piperazină (Nematocton), tetramisol (Decaris), mebendazol (Vermox), thiabendazol (Mintezol) etc.

c. Examenul hematologic arată o eozinofilie de 40-60% în stadiul larvar pulmonar care descreşte apoi, stabilindu-se în etapa intestinală la valori de 10%.

d. Examenul radiologic al tractusului intestinal precizează diagnosticul numai în cazul parazitării de către indivizii masculi.

2. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL ENTEROBIOZEI

Enterobioza sau oxiuroza este o boală contagioasă, cu caracter familial sau de colectivitate, frecvent întîlnită la copii, cauzată de Enterobius vermicularis (sin. Oxyuris vermicularis). Paraziţii adulţi habitează în cec unde se acuplează. Femelele gravide migrează spre anus, în special noaptea,şi îşi depun ouăle, care conţin un embrion giriniform, în regiunea perianală. După depunere, ouăle îşi continuă evoluţia şi embrionii giriniformi se transformă, în cîteva ore, în larve vermiforme alungite; în acest moment ouăle devin infecţioase. Pruritul pe care îl provoacă paraziţii în timpul depunerii ouălor determină, mai ales la copii, o scărpinare violentă şi trecerea unor ouă sub unghii. Se produce astfel o reinfecţie prin contactul mînă-gură sau prin contaminarea alimentelor, apei, lenjeriei etc, unde ouăle pot supravieţui cîteva săptămîni. Introduse în tubul digestiv prin mîini murdare, obiecte sau alimente contaminate, ouăle vor elibera larva care ajungînd în regiunea cecală se transformă în adult.

Diagnosticul enterobiozei este un diagnostic parazitologic.

Diagnostic parazitologic

Diagnosticul de certitudine se stabileşte prin evidenţierea ouălor recoltate din pliurile anale sau a adulţilor în materiile fecale.

Prelevarea ouălor se face prin metode speciale: Hall, Graham, etc.

Metoda Hall utilizează o baghetă de sticlă învelită,la unul din capete, cu o peliculă de colodiu sau cu o foiţă de celofan de mărimea unei lamele de 18/18 mm. Cu această baghetă se şterg pliurile anale, dimineaţa, anterior defecaţiei şi toaletei locale.

Rezultate mai bune se obţin prin aplicarea în regiunea perianală a unei baghete de sticlă dublată de o hîrtie adezivă (scotch) - metoda Graham.

a. Examenul microscopic al amprentei anale. In laborator, foiţa de celofan sau colodiu se secţionează, se întinde pe o lamă, se umectează cu o picătură de soluţie salină izotonă şi se trans-

formă într-un preparat proaspăt. Se examinează la microscop cu obiectiv 10x şi ocular 7 sau 10. Se pot evidenţia ouăle de formă ovalară, uşor asimetrice, măsurînd 50-60 µm 1/30 µm Ø, acoperite de un înveliş dublu, subţire, transparent; în interior conţin un embrion giriniform.

Fig.97 E.vermicularis
1=femelă; 2=mascul;
3=ou embrionat.

b. Examenul macroscopic poate evidenţia frecvent adulţii în materii fecale sau perianal. Sînt viermi mici, subţiri, de culoare albă. Femela măsoară 12 mm 1/0,5 mm Ø şi prezintă extremitatea posterioară efilată ca un ac; de aici denumirea de oxiur care în greceşte înseamnă „coadă ascuţită". Masculul este mai mic, 2-5 mm 1/0,2 mm Ø, şi prezintă extremitatea posterioară curbată ventral (fig.97).

c. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. E.vermicularis este sensibil la pamoat de pirvinium (Vermigal), pamoat de pirantel (Combantrin), mebendazol (Vermox) etc., eficiente în doză unică. Tratamentul trebuie repetat după 2 săptămîni.

Sărurile de piperazină (Nematocton) sînt, de asemenea, eficiente dar trebuie administrate timp de o săptămînă.

3. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL TRICHINOZEI

Trichinoza sau trichineloza este cauzată de Trichinella spiralis. Rezervorul de infecţie îl constituie şobolanii, unele animale carnivore domestice şi sălbatice.

Infecţia umană se produce prin consum de carne de porc, mistreţ sau urs, crudă sau insuficient preparată termic care conţine larve închistate. După ingestie, sub acţiunea sucurilor digestive, larvele sînt eliberate din chisturile lor, pătrund în grosimea peretelui intestinal şi se transformă în adulţi după 36-48 ore. Adulţii revin în lumenul intestinal unde se acuplează, apoi masculii se elimină cu materiile fecale. Femelele fecundate pătrund în mucoasa intestinală începînd din a 6-a - a 7-a zi de la infecţie şi eli-

mină larve toată viaţa lor (28 zile). Larvele se diseminează pe cale sangvină în întreg organismul, localizîndu-se în muşchii striaţi cei mai activi: muşchii limbii, diafragm, muşchii intercostali, deltoid etc. La nivelul muşchilor larvele se închistează, cresc (pînă la 600-1000 /um) şi se spiralează.

Infecţiile cu număr redus de paraziţi sînt asimptomatice; infecţiile masive evoluează sever, ducînd, uneori, la moarte.

Trichineza evoluează în 3 faze:

- faza intestinală, în care larvele ingerate se transformă în adulţi;
- faza de diseminare a noilor larve în sînge;
- faza musculară, de localizare a larvelor în muşchi.

Faza intestinală, caracterizată prin diaree, dureri abdominale etc., începe după 1-3 zile de la prînzul infectant şi durează aproximativ 7 zile.

Faza de diseminare, începe la o săptămînă după infecţie şi se manifestă prin febră continuă (39-40°C), edeme faciale şi palpebrale, crampe musculare (interesînd mai ales muşchii maseteri care se contractă provocînd un trismus caracteristic), eozinofilie sangvină ridicată (50-80%).

Faza de închistare a larvelor, ce survine în a 3-a săptămînă de boală, se caracterizează prin mialgii funcţionale. Deşi închistarea se produce numai în muşchi, larvele pot infecta şi alte organe: pulmoni, cord, creier; invazia acestor organe poate provoca moartea în primele faze ale bolii.

Diagnosticul se stabileşte clinic dacă simptomatologia bolii este tipică şi este facilitat de apariţia simptomelor la un număr de indivizi care au consumat carne de porc infestată (necontrolată, provenită din sacrificări particulare).

In formele fruste sau cronice se impune un diagnostic de laborator care se stabileşte parazitologic şi serologic.

a. Diagnostic parazitologic

Diagnosticul parazitologic de certitudine este rareori posibil. El se bazează pe evidenţierea adulţilor în materii fecale şi a larvelor în sînge şi muşchi.

1. Examenul coproparazitologic direct sau după concentrare, indicat în stadiul diareic (faza intestinală) poate evidenţia, une-

ori, adulţii.

Adulţii sînt viermi mici, de culoare albicioasă: masculul măsoară 1,5-2 mm 1/40 µm ∅; este lăţit în partea posterioară care se termină cu 2 apendici caudali; femela, de 3-4 mm 1/60 µm ∅, are extremitatea anterioară subţire iar cea posterioară terminată obtuz (fig.98).

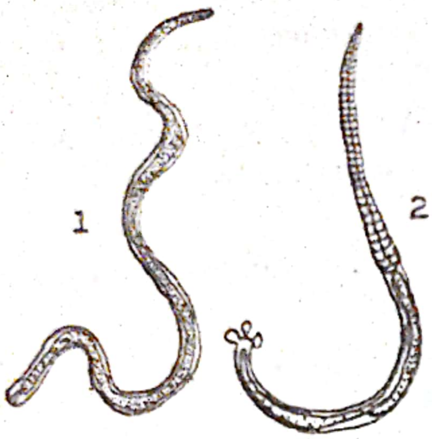


Fig.98 T.spiralis
1=femelă; 2=mascul.

ii. Examenul sîngelui, după metoda Staübli [x], efectuat în faza de diseminare între a 7-a - a 25-a zi de boală, poate evidenţia, uneori, larvele.

Larvele măsoară 80-120 µm 1/5-6 µm ∅; prezintă anterior un buton cefalic şi sînt uşor îngroşate la extremitatea posterioară.

iii. Biopsia musculară se practică tardiv, la 3-4 săptămîni de la infecţie. Se prelevă un fragment din muşchii deltoid, intercostal sau solear (în apropierea tendonului lui Achile), de mărimea unui bob de mazăre; se presează între 2 lame şi se examinează la microscop cu obiectiv 10x şi 40x.

Examenul microscopic poate evidenţia larvele neînchistate, aşezate de-a lungul fibrelor musculare, sau larvele spiralate.

Fig.99 T.spiralis
Larvă închistată în muşchi.

Larvele sînt transparente, refringente, uşor de recunoscut.

Dacă acest examen este negativ, se practică examenul histologic.

Examenul histopatologic al fragmentului biopsic poate evidenţia chisturi de T.spiralis: formaţiuni ovalare, dispuse interfascicular, paralel cu axul longitudinal al fibrelor, cu aspect de lămîie, măsurînd 500 µm 1/250 µm ∅ şi incluzînd o larvă spiralată (fig.99).

---

x) 10 ml sînge venos, recoltat pe anticoagulant, se hemolizează cu 100 ml acid acetic 30%; se centrifughează iar din sediment se fac preparate umede sau frotiuri colorate MGG

Scanned with OKEN Scanner

Metoda biopsiei musculare permite un diagnostic pozitiv în 50% din cazuri; fiind tardivă, dureroasă, nu are valoare practică. Datorită acestor inconveniente se indică serodiagnosticul.

iv. Sensibilitatea la medicamente antiparazitare. *T.spiralis* în stadiul adult, în intestin, este sensibilă la mebendazol (Vermox) şi flubendazol (Fluvenal).

Larvele, în faza musculară, sînt sensibile la preparate de dietil-carbamazină (Notezin, Loxuran). Mai eficient este thiabendazolul (Mintezol) şi albendazolul (Zentel).

b. Diagnostic imunologic

Diagnosticul imunologic constă în evidenţierea stării de sensibilizare alergică prin intradermoreacţie şi a anticorpilor prin testul de precipitare larvară, IFI, testul de floculare a bentonitei, ELISA, etc.

Testul intradermic (Bachman). Se injectează pe faţa anterioară a antebraţului 0,1 ml antigen (obţinut din larvele parazitului) diluat 1/10.000.

Reacţia imediată (cu valoare diagnostică) apare după 10-20 minute şi constă dintr-o papulă albicioasă înconjurată de o zonă eritematoasă, uşor edemaţiată.

Reacţia tardivă, asemănătoare ca aspect, măsoară 2-3 cm Ø şi apare după 10-24 ore de la injecţie.

Testul cutanat se pozitivează din a 2-a săptămînă de boală şi se menţine pozitiv timp îndelungat. El trebuie completat cu un test serologic care va indica dacă infecţia este recentă.

Anticorpii anti-*T.spiralis* apar în sînge în titruri decelabile după 2-3 săptămîni de la debutul bolii şi persistă mai mulţi ani după vindecare.

Testul de microprecipitare larvară (testul Roth) foloseşte ca antigen larve liofilizate sau larve vii obţinute prin digestie peptică a unor muşchi proveniţi de la animale infectate experimental. In prezenţa anticorpilor specifici apar precipitate microscopice în jurul orificiului bucal al larvelor.

Astăzi sînt preferate testele IFI şi ELISA care se pozitivează precoce şi sînt foarte sensibile.

IFI se pozitivează după 10-20 zile de la infecţie, atinge un maximum în a 45-a - a 60-a zi şi se menţine pozitivă un an de la

infecţie.

Testul standard, practicat în laboratoarele de referinţă, în faza acută a bolii, este testul de floculare a bentonitei, care utilizează ca antigen extract de T.spiralis adsorbit pe bentonită.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA

1. Balş M.(1982): Laboratorul clinic în infecţii. Editura Medicală Bucureşti.
2. Beaver P.C., Jung R.C., Cupp J.E.(1984): Clinical Parasitology. Ed.a 9-a. Lee and Febiger, Philadelphia.
3. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984). Ed.a 9-a, vol.I,II. Williams and Wilkins, Baltimore, London.
4. Bîlbîie V., Pozsgi N.(1984 şi 1985): Bacteriologie medicală, vol.I,II. Editura Medicală, Bucureşti.
5. Buiuc D., Duca M., Luca M.(1987): Curs de Microbiologie Medicală, Litografia IMF Iaşi.
6. Buiuc D. şi colab.(1982): Microbiologie practică, Litografia IMF Iaşi.
7. Byström A., Sundqvist G.(1981): Bacteriologic Evaluation of the Efficacy of Mechanical Root Canal Instrumentation in Endodontic Therapy.Scand.J.Dent.Res., 89: 321-328.
8. Davis B.D. et al.(1980): Microbiology.Ed.a 3-a Harper and Row Publishers.Cambridge, New York, Philadelphia.
9. Degas F.(1981): Virus de l'hépatite B.Signification de ses marqueurs et perspectives de la vaccination.Rev. Prat.31: 2451-2454.
10. Dimitriu St., Teodorovici Gr.(1986): Boli infecţioase şi Epidemiologie. Litografia IMF Iaşi.
11. Duca M.(1986 şi 1987): Sindromul de imunodeficienţă dobîndită (SIDD). Rev.Med.Chirurg.Iaşi, 90,4: 601-609 şi 91, 1: 19-28.
12. Duca M., Alexandrescu M. şi colab.(1979): Lucrări practice de microbiologie. Vol.II Virologie. Litografia IMF Iaşi.

13. Haralamb E.(1982): Parazitologie practică. Litografia IMF Iaşi.
14. Ivanof A., Ciupe M. şi colab.(1982): Microbiologie.Editura didactică şi pedagogică, Bucureşti.
15. Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A.(1982): Review of Medical Microbiology. Ed.a 15-a. Lange Medical Publications, Los Altos, California.
16. Lennette E.H.(1980): Manual of Clinical Microbiology. Ed.a 3-a. American Society for Microbiology, Washinton.
17. Mammete A. et colab.(1983): Virologie médicale. Edit.Crouan et Roques, Lille, France.
18. Nol... W.A.(1982): Oral Microbiology. The C.V. Mosby Comp., London.
19. Orland F.(1982): Microbiology in Clinical Dentistry. Edit. John Wright, Boston, Bristol, London.
20. Păun L.(1988): Infecţia cu virusul imunodeficienţei umane (HIV). Editura Medicală, Bucureşti.
21. Ross P.W., Holbrook W.P.(1984): Clinical and Oral Microbiology. Blackwell Scientific Publications, Melbourne.
22. Schafer W.B. et al.(1983): A Textbook of Oral Pathology. W.B. Saunders Comp. London.
23. Volk W.A., Wheeler M.F.(1984): Basic Microbiology. Ed.a 5-a, Harper and Row Publishers, New York.
24. Zachariae H.(1985): Herpesvirus Infection in Man.Scand.J.Infect.Dis., suppl., 47:44.
25. Zambon J.L. et al.(1983): Actinobacillus actinomycetecomitans in human periodontal disease.J.Periodontal, 54, 12: 707-711.
26. x x x Techniques rapides de laboratoire pour le diagnostic des infections virales.Rapp.Techn.O.M.S., 1981, No.661.
27. x x x Détection des antigènes et des anticorps IgM pour le diagnostic rapid des infections virales: Mémorandum O.M.S.,Bull.Wld.Hlth.Org., 1980,58: 417.
28. x x x Les maladies à virus des voies respiratoires.Rapp. Techn. O.M.S., 1980, No.642.